

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Etude comparée de l'effet de l'hypoxie chronique et de l'hypoxie intermittente sur l'apoptose des cellules endothéliales induite par l'étoposide

CRESPIN, Marianne

Award date:
2005

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**Etude comparée de l'effet de l'hypoxie chronique et de l'hypoxie intermittente
sur l'apoptose des cellules endothéliales induite par l'étoposide**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Marianne CRESPI
Juin 2005



**FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**Etude comparée de l'effet de l'hypoxie chronique et de l'hypoxie intermittente
sur l'apoptose des cellules endothéliales induite par l'étoposide**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Marianne CRESPI
Juin 2005

Etude comparée de l'effet de l'hypoxie chronique et de l'hypoxie intermittente sur l'apoptose des cellules endothéliales induite par l'étoposide

CRESPIN Marianne

Résumé

Au cours de ces dernières décennies, le nombre de personnes atteintes d'un cancer a augmenté de façon importante. Pour soigner ces cancers, une des approches thérapeutiques existantes est la thérapie anti-angiogénique. Elle consiste à asphyxier la tumeur en inhibant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins irriguant les cellules tumorales. Mais jusqu'à présent, ces nouvelles approches prometteuses chez la souris se sont révélées décevantes lorsqu'elles ont été expérimentées chez les patients, probablement parce que l'architecture des vaisseaux des tumeurs chez l'homme est aberrante. Dans ce mémoire, nous avons essayé de mieux comprendre les mécanismes de cette résistance afin d'améliorer ces thérapies à long terme.

Dans le but de voir si l'hypoxie engendrée par la mauvaise irrigation des tumeurs interfère avec les effets de la thérapie anti-angiogénique, trois approches ont été développées au cours de ce mémoire. La première a eu pour but d'étudier l'influence, dans les cellules endothéliales EAhy926, des conditions d'incubation en hypoxie chronique (7 heures et 16 heures) et/ou en hypoxie intermittente (7 heures) sur le processus menant à l'apoptose induite par un agent utilisé dans le traitement des cancers, l'étoposide. La deuxième approche a été de suivre, dans ces mêmes conditions, l'expression d'une série de gènes dont les produits sont impliqués dans la régulation de l'apoptose. La troisième approche a été consacrée à l'étude de l'effet de l'étoposide et de l'hypoxie, seuls ou combinés, sur l'activité de deux facteurs de transcription, p53 et AP-1, connus pour jouer un rôle dans l'initiation de l'apoptose.

Les résultats obtenus montrent que l'hypoxie peut, d'une part, influencer l'apoptose induite par l'étoposide et d'autre part, moduler les variations d'expression des gènes induites par l'étoposide. De plus, ce travail nous a également permis de constater que l'étoposide active au moins deux facteurs de transcription : p53 et AP-1 ; alors que l'hypoxie n'influence pas l'activation de AP-1 induite par l'étoposide mais diminue celle de p53. Enfin, nos résultats montrent que l'ajout d'un inhibiteur de AP-1 aggrave l'apoptose en présence d'étoposide que ce soit en normoxie ou en hypoxie. On peut donc envisager que l'hypoxie protège les cellules endothéliales de l'apoptose au moins en partie en activant le facteur AP-1 et/ou en inhibant l'activation de p53.

Voici venue la fin de mes quatre années de Biologie et il est temps de remercier les personnes ayant contribué à la réussite de mes études et à l'accomplissement de ce travail.

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Biologie Cellulaire des FUNDP sous la direction du Professeur J. Remacle. Je le remercie pour avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires à la réalisation de ce mémoire.

Je remercie particulièrement ma promotrice Carine Michiels pour son accueil au sein de son équipe, pour ses nombreux conseils, pour ses corrections ultra-rapides et pour sa disponibilité et son suivi tout au long de ce mémoire.

Je voudrais également remercier les membres de l'équipe HIF pour leurs bons conseils et plus particulièrement Sébastien Toffoli pour m'avoir accompagnée lors de mon apprentissage, pour son aide précieuse, pour ses conseils scientifiques et pour ses encouragements dans les moments difficiles.

Je remercie aussi Noëlle Ninane et Catherine Demazy pour l'observation de mes nombreuses IF.

Merci à Damien, Guillaume, Julien et Lionel pour les petits coups de main informatiques et merci à Audrey et Frédérique pour la bonne ambiance au sein de notre bureau des mémorantes.

Merci à mes quatre biologistes préférés : merci Amandine pour les bons fous rires et pour les bons moments passés ensemble tous les mardis soirs ; merci Fred pour ta sympathie, ta simplicité, et ton écoute ; merci Hélène pour ton amitié sincère durant ces quatre années et pour les innombrables moments passés ensemble, j'espère que cette amitié durera encore longtemps ; merci Maxime pour ton aide précieuse dans les cours que je ne maîtrisais pas trop et pour tous les bons délires lors de certains TP.

Enfin, je voudrais remercier mes parents de m'avoir permis de faire ces belles études ; je les remercie également, ainsi qu'Hubert et Thérèse, de m'avoir supportée, soutenue et encouragée tout au long de ces quatre années.

Liste des abréviations utilisées

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADP	Adénosine diphosphate
AIF	Apoptosis Inducing Factor
Akt	Protéine kinase B (PKB)
ANT	Transporteur de nucléotide adénylique
AP-1	Activated Protein-1
Apaf-1	Apoptotic protease-activating factor-1
APS	Ammonium PerSulfate
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	ARN ribosomal
ARNm	ARN messenger
ARNT	Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
Asp	Aspartate
ATM	Ataxia telangiectasia-mutated
ATP	Adénosine triphosphate
ATPases	ATP synthase
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BH	Bcl2 Homology domain
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
BSA	Bovine Serum Albumin
CAD	transActivation Domain C-terminal
CAD	Caspase Activated-DNase
CARD	Caspase Recrutement Domain
Caspase	CysteinyI aspartate-specific protease
CO ₂	Dioxyde de carbone
Ct	Cycle treshold
Ctrl	Contrôle
Cyt c	Cytochrome c
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DIABLO	Direct IAP Binding protein with Low pI
DISC	Death-inducing Signaling Complex
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTP	Déoxynucléotides triphosphate
DO	Densité optique
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Ethylène Diamine Tétra Acétique
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

Endo G	Endonucléase G
EPO	Erythropoïétine
Etop	Etoposide
FADD	Fas Associated Death Domain
FasL	Ligand de Fas
FGF	Fibroblast growth factor
FLIP	Fllice Inhibitory Protein
FLT ₁	Fms-like tyrosine kinase
GLUT1	Transporteur de glucose 1
HB	Hypotonic Buffer
HC	Hypoxie chronique
HEPES	Hydroxylethyl piperazine-ethane sulfonic acid
HI	Hypoxie intermittente
HIF-1	Hypoxia Inducible Factor-1
HRE	Hypoxia Responsive Element
HRP	Horse Radish Peroxidase
IAP	Inhibitor of apoptosis proteins
ICAD	Inhibitor of CAD
ID	Inhibitory Domain
IgG	Immunoglobuline G
IOD	Integrated optical density
JNK	Jun N-terminale kinase
kDa	Kilo Dalton
KDR	Kinase domain containing receptor
λ	Longueur d'onde
mA	Milli Ampère
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MDR	Multi Drug Resistance
MLS	Signal de localisation mitochondrial
MMP	Métalloprotéinase matricielle
N	Normoxie
NAD	TransActivation Domain N-terminal
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NF- κ B	Nuclear Factor kappa B
NLS	Nuclear Localisation Sequence
NRP	Neuropiline
ODD	Oxygen dependent Degradation Domain
Oligo	Oligonucléotide
O ₂	Oxygène
PARP	Poly (ADP-ribose) polymérase
PAS	Per-ARNT-Sim
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor

PFA	Paraformaldéhyde
PIB	Phosphatase Inhibitor Buffer
PIC	Phosphatase Inhibitor Cocktail
PI3K	Phosphatidyl inositol 3-phosphate kinase
PIGF	Placental growth factor
PNPP	Para-nitrophényl phosphate
PTP	Permeability Transition Pore
PVDF	PolyVinylidène DiFluoride
pVHL	Protéine von Hippel-Lindau
RE	Tampon de resuspension
RIP	Receptor Interactive Protein
RLU	Relative Light Units
rpm	Rotations par minute
RT PCR	Reverse Transcription Polymerase chain reaction
SA	Tampon salin
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SMAC	Second Mitochondria-derived Activator of Caspase
SP600125	inhibiteur de la JUN Kinase
TBS	Tris Buffer Saline
TEMED	N,N,N',N'-tétraméthyl-éthylènediamine
TGF-β	Transforming growth factor-β
TM	Trans-membranaire
TMB	Tétra-méthyl benzidine
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFR	Récepteur au TNF
TRADD	TNF-R Associated Death Domain
TRAF2	TNFR-Associated Factors 2
TRIS	Tris Hydroxy Méthyl Aminométhane
TSP-1	Thrombospondine-1
Tween	Polyoxyéthylène sorbitan monolaurate
U	Unité enzymatique
VDAC	Voltage dependant anion channel
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Récepteur au VEGF
VPF	Vascular Permeability Factor
µg :	10 ⁻⁶ gramme
µl :	10 ⁻⁶ litre

Table des matières

Introduction

Avant-propos	1
I. L'hypoxie.....	2
1. Introduction	2
2. Le facteur de transcription HIF-1	2
II. L'angiogenèse	4
1. Principe.....	4
2. Médiateurs positifs de l'angiogenèse	5
2.1. Le VEGF	5
2.2. Le bFGF	5
3. La néoangiogenèse tumorale	5
4. La vascularisation tumorale	6
III. Hypoxie Intermittente.....	6
IV. Thérapies anti-angiogéniques.....	7
1. Introduction	7
2. Exemples de thérapies anti-angiogéniques	8
2.1. Les inhibiteurs des facteurs pro-angiogéniques	8
2.2. Les inhibiteurs angiogéniques endogènes	8
2.3. Les inhibiteurs des métalloprotéinases matricielles	9
2.4. Les bloqueurs des intégrines	9
2.5. D'autres inhibiteurs de l'angiogenèse	9
3. Avantages des approches anti-angiogéniques	9
4. Des expériences quelque peu décevantes	10
5. La thérapie anti-néovasculaire	11
V. L'apoptose	12
1. Introduction	12
2. Caractéristiques morphologiques et biochimiques des cellules en apoptose	12
3. Acteurs moléculaires principaux de l'apoptose	12
3.1. Les caspases	12
3.1.1. Structure des caspases	13
3.1.2. Les différentes classes de caspases et leur activation	13
3.1.3. Principaux substrats des caspases et conséquences de leur clivage	14
3.2. Les membres de la famille Bcl-2.....	14
3.2.1. Structure des membres de la famille Bcl-2	14
3.2.2. Localisation des membres de la famille Bcl-2	15
3.2.3. Interactions entre les membres de la famille Bcl-2	15
4. Rôle de la mitochondrie dans l'apoptose	16
4.1. Généralités.....	16
4.2. Mécanismes de libération du cytochrome c	16
4.2.1. La théorie de la rupture de la membrane externe mitochondriale.....	16
4.2.2. Le pore de transition de perméabilité membranaire.....	16
4.2.3. La théorie du pore formé par les membres de la famille Bcl-2	17
4.3. La voie mitochondriale d'initiation de l'apoptose	17
4.3.1. Le cytochrome c	17
4.3.2. La protéine Apaf-1	17
4.3.3. La formation de l'apoptosome	17
4.4. Régulation des voies dépendantes des caspases.....	18

4.4.1. Les protéines inhibitrices de l'apoptose ou IAPs.....	18
4.4.2. Les inhibiteurs des IAPs.....	18
4.4.3. La protéine AIF	18
5. Les différentes voies d'initiation de l'apoptose	18
5.1. La voie des récepteurs de mort ou voie extrinsèque	18
5.1.1. La voie FasL/Fas	19
5.1.2. La voie TNF-TNF-R	19
5.1.3. Amplification de la voie des récepteurs de mort.....	19
5.2. La voie mitochondriale ou voie intrinsèque	20
5.2.1. La privation de facteurs de croissance	20
5.2.2. Les dommages à l'ADN	20
Objectifs	21

Matériel et Méthodes

I. Culture Cellulaire.....	22
1. Matériel	22
2. Méthode.....	22
II. Incubation sous hypoxie.....	22
1. Matériel	22
2. Méthode.....	23
III. Dosage de l'activité des caspases en fluorescence.....	23
1. Principe.....	23
2. Matériel	23
3. Méthode.....	23
IV. Dosage de l'activité des caspases en luminescence	23
1. Principe.....	23
2. Matériel	24
3. Méthode.....	24
V. ELISA Caspase-3 Active.....	24
1. Principe.....	24
2. Matériel	24
3. Préparation des extraits	24
4. Dosage.....	25
VI. Western Blot	25
1. Principe.....	25
2. Matériel	25
Pour le lysat cellulaire total	25
Pour le dosage des protéines par la méthode de Bradford	26
Pour la préparation des échantillons	26
Pour l'électrophorèse	26
Pour le transfert	26
Pour le traitement de la membrane, l'incubation avec les anticorps et la révélation ..	26
3. Lysat cellulaire total	26
4. Dosage des protéines par la méthode de Bradford	26
5. Préparation des échantillons.....	27
6. Electrophorèse	27
7. Transfert	27
8. Traitement de la membrane, incubation avec les anticorps et révélation.....	27
VII. Immunofluorescence	28

1. Principe.....	28
2. Matériel	28
3. Méthode.....	28
VIII. L'apoptochip.....	29
1. Principe.....	29
2. Matériel	29
Pour l'extraction d'ARN total :	29
Pour la reverse transcription :	29
3. Extraction d'ARN total	29
4. Reverse Transcription avec marquage indirect	30
5. Hybridation.....	30
IX. Real-time RT PCR	30
1. Principe.....	30
2. Matériel	30
Pour l'extraction d'ARN total	30
Pour la reverse transcription	30
Pour la Real-time PCR	31
3. Extraction d'ARN total	31
4. Reverse Transcription	31
5. Real-time PCR.....	31
X. Trans-AM.....	31
1. Principe.....	31
2. Matériel	32
Pour l'extraction nucléaire	32
Pour le dosage	32
3. Extraction nucléaire.....	32
4. Dosage de l'activité de liaison du facteur de transcription à sa séquence consensus ..	32

Résultats et Discussion

I. Effet de l'hypoxie chronique et de l'hypoxie intermittente sur l'apoptose induite par l'étoposide	33
1. Etude de l'activité globale des caspases.....	33
2. Evolution de la quantité de la forme clivée de la caspase-9.....	34
3. Etude de l'activité des caspases effectrices -3 et -7	34
4. Etude de l'activation de la caspase-3 induite par l'étoposide	35
5. Evolution de la quantité de la forme clivée de la protéine PARP	35
6. Etude de la localisation subcellulaire de la forme active de la caspase-3	36
II. Etude de l'expression des gènes impliqués dans l'apoptose	38
1. Etude de l'expression des gènes impliqués dans l'apoptose au moyen de l'apoptochip	38
2. Etude de l'expression de quatre gènes impliqués dans l'apoptose par real-time RT PCR	40
3. Etude du niveau d'expression des protéines c-jun et p21 par western blot.....	41
III. Rôle des facteurs de transcription p53 et AP-1	43
1. Activité de liaison à l'ADN de p53 et AP-1.....	43
2. Rôle du facteur AP-1 dans la protection contre l'apoptose induite par l'étoposide.....	44
2.1. Activité des caspases.....	45
2.2. Etude du clivage de PARP	45

Conclusion et Perspectives

Conclusion et perspectives.....	47
---------------------------------	----

Bibliographie

Bibliographie.....	52
--------------------	----

Annexe 1 : Liste des gènes détectables à l'aide de la DualChipTM human apoptosis

Introduction

Avant-propos

Au cours de ces dernières décennies, le nombre de personnes atteintes d'un cancer a augmenté de façon importante. Cette augmentation est principalement due au vieillissement des populations. Pour soigner ces cancers, différentes approches thérapeutiques existent, pouvant même être combinées. Cependant, ces approches ne sont pas toujours efficaces, notamment à cause des phénomènes de résistance.

Dans les années '70, on a découvert que la croissance tumorale dépendait du recrutement de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de capillaires adjacents. Ce processus, appelé néoangiogenèse, a mené à l'idée que cibler cette nouvelle vascularisation pourrait être une nouvelle voie d'approche thérapeutique. En effet, cette approche conduirait à asphyxier la tumeur et ainsi à la mort des cellules cancéreuses.

Mais jusqu'à présent, ces nouvelles approches prometteuses chez la souris se sont révélées décevantes lorsqu'elles ont été expérimentées chez les patients. On peut cependant essayer de mieux comprendre les mécanismes en jeu pour tenter d'améliorer ces thérapies. C'est dans ce contexte que ce mémoire a été réalisé. Avant d'en préciser les objectifs, nous passerons en revue lors de l'introduction, d'une part, les concepts permettant de comprendre ce qu'est cette angiogenèse et comment on peut la cibler de manière médicamenteuse, et d'autre part, les mécanismes responsables de la mort cellulaire, but des thérapies anti-cancéreuses.

I. L'hypoxie

1. Introduction

L'homme, comme la plupart des espèces animales, présente une dépendance totale vis-à-vis de l'oxygène pour sa survie. C'est pourquoi, chez les espèces multicellulaires, les organes ont évolué de manière à capturer l'oxygène (les poumons), à le transporter (le sang), et à le distribuer aux tissus (le système cardiovasculaire) (Wenger, 2002). Cet oxygène est un substrat essentiel car il sert d'accepteur final des électrons dans la respiration cellulaire et permet donc aux cellules de synthétiser de l'ATP via la phosphorylation oxydative (Rajendran et Krohn, 2005) (Figure 1).

Cependant, il arrive, dans des conditions normales ou pathologiques, que l'environnement de la cellule devienne hypoxique. La dépendance cellulaire de la respiration aérobie en tant que source d'énergie obligatoire requiert alors une multitude de réponses à ce manque d'oxygène ou hypoxie (Gleadle et Ratcliffe, 2001). En effet, en absence d'oxygène, les phosphorylations oxydatives ralentissent, ce qui entraîne une incapacité partielle à générer de l'ATP. Or l'ATP est essentiel pour maintenir la viabilité cellulaire : la cellule meurt lorsque la production d'ATP ne suffit plus à maintenir les équilibres ionique et osmotique.

En réponse à cette hypoxie, les cellules eucaryotes vont donc s'adapter afin de s'assurer un apport en ATP suffisant pour survivre. D'une manière générale, ces adaptations se traduisent par une réorganisation du métabolisme énergétique entraînant une production d'ATP indépendante de l'oxygène (via l'activation de la glycolyse) ainsi que par l'augmentation du transport du glucose vers l'intérieur de la cellule (Janssens et al., 1995). Une autre adaptation consiste en l'activation de la néoangiogenèse, c'est-à-dire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins ayant pour but de procurer l'oxygène aux tissus qui en manquent.

Il est important de remarquer que tous ces mécanismes adaptatifs font suite à l'activation directe de divers facteurs de transcription en condition d'hypoxie ; le facteur le plus important dans cette réponse est HIF-1 pour Hypoxia Inducible Factor-1 (Semenza, 2000 ; Gleadle et Ratcliffe, 2001). Ce facteur de transcription joue un rôle primordial en induisant l'expression de nombreux gènes participant à la réponse adaptative des cellules à l'hypoxie (Figure 2).

2. Le facteur de transcription HIF-1

HIF-1 est une protéine hétérodimérique constituée des sous-unités HIF-1 α et HIF-1 β (ou ARNT pour Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator). Les deux sous-unités contiennent les domaines bHLH (basic helix-loop-helix) et PAS (Per-ARNT-Sim) dans la partie amino-terminale (Figure 3) (Semenza, 2000).

Alors que la protéine ARNT est constitutivement exprimée dans les cellules de mammifère en condition de normoxie, la protéine HIF-1 α ne l'est pas. En effet, l'expression de la sous-unité HIF-1 α est étroitement régulée par la concentration en O₂ cellulaire, elle augmente de manière exponentielle quand la concentration en O₂ décline, et elle détermine le niveau d'activité de HIF-1.

En condition de normoxie, le temps de demi-vie cellulaire de HIF-1 α est d'environ 5 minutes. Ceci est dû au fait que HIF-1 α est sujet à l'ubiquitination et à la dégradation par le protéasome. Par contre, en condition d'hypoxie, la protéine HIF-1 α est stabilisée par l'absence d'une hydroxylation post-traductionnelle à la proline 564 de la molécule HIF-1 α (Semenza, 2000 ; Duffy et al., 2003) (Figure 4).

La sous-unité HIF-1 α stable transloque vers le noyau grâce à une séquence signal de localisation nucléaire (ou NLS) et dimérise avec ARNT. Pour activer la transcription des gènes régulés par l'hypoxie, le complexe HIF-1 hétérodimérique se lie à l'ADN à des HRE (Hypoxia Responsive Elements) spécifiques caractérisés par la séquence consensus 5'-RCGTG-3' (Figure 4). C'est par l'intermédiaire des domaines HLH et PAS que le complexe HIF-1 dimérise, tandis que le domaine basique sert à lier l'ADN (Semenza, 2000).

Une fois la translocation nucléaire et la dimérisation réalisées, l'activation de la transcription a lieu (Figure 4). Les gènes transcrits codent pour l'érythropoïétine (pour la distribution de l'O₂), les transporteurs du glucose et les enzymes glycolytiques (pour le métabolisme énergétique), le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) (pour l'angiogenèse), et d'autres gènes dont les protéines augmentent la distribution de l'O₂ ou facilitent l'adaptation métabolique à l'hypoxie (Semenza, 2000 ; Gleadle et Ratcliffe, 2001) (Figure 2).

En résumé, l'hypoxie mène à la stabilisation de HIF-1 α , à sa translocation dans le noyau cellulaire, à sa dimérisation avec la sous-unité ARNT pour former le complexe HIF-1, et à l'activation de la transcription par la liaison de HIF-1 à des HRE spécifiques situés dans le promoteur de ses gènes cibles (Semenza, 2000).

II. L'angiogenèse

1. Principe

L'angiogenèse est le processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. L'angiogenèse se produit majoritairement chez l'embryon pour établir la vascularisation primaire ainsi qu'une vasculature adéquate pour la croissance et le développement des organes. L'angiogenèse se produit également chez l'adulte durant le cycle menstruel et durant les processus de réparation physiologique comme la cicatrisation tissulaire. Cependant, il y a très peu de renouvellement des cellules endothéliales dans la vasculature adulte en condition normale (Papetti et Herman, 2002 ; Bergers et Benjamin, 2003).

La vasculature adulte est dérivée d'un réseau de vaisseaux sanguins initialement créé dans l'embryon par vasculogenèse, un processus par lequel les vaisseaux sont formés de novo à partir de précurseurs de cellules endothéliales appelés angioblastes (Bergers et Benjamin, 2003). Durant la vasculogenèse, les angioblastes prolifèrent et s'assemblent spontanément en tubules qui fusionnent pour former un réseau primitif de vaisseaux nommé plexus capillaire primaire. Le treillis de cellules endothéliales créé par vasculogenèse sert ensuite d'échafaudage pour l'angiogenèse. En effet, après sa formation, le plexus capillaire primaire est remodelé par le bourgeonnement et les ramifications de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants par le processus d'angiogenèse (Jussila et Alitalo, 2002 ; Papetti et Herman, 2002).

Il existe deux types d'angiogenèse impliqués tous les deux dans la vascularisation des organes : l'angiogenèse par bourgeonnement et l'angiogenèse par intussusception.

En condition normale, l'angiogenèse est régulée par un équilibre entre les molécules pro-angiogéniques et anti-angiogéniques. L'angiogenèse est initiée lorsque cet équilibre penche en faveur des molécules pro-angiogéniques (comme le VEGF) qui activent les cellules endothéliales alors au repos.

L'angiogenèse est un processus complexe impliquant la coordination de plusieurs processus : le remodelage de la matrice extracellulaire, la migration des cellules endothéliales, leur prolifération et la maturation des vaisseaux sanguins (Senger et al., 1997).

Pour que le bourgeonnement des vaisseaux sanguins se produise, les cellules murales (les péricytes) doivent d'abord être enlevées des vaisseaux se ramifiant (Figure 5 [1]). La membrane basale et la matrice extracellulaire des cellules endothéliales sont ensuite dégradées et remodelées par des protéases spécifiques, comme les métalloprotéinases de la matrice, et ensuite une nouvelle matrice est synthétisée par les cellules stromales (Figure 5 [2]). Cette nouvelle matrice et certains facteurs de croissance solubles (comme le VEGF) favorisent la migration et la prolifération de cellules endothéliales vers ces stimuli angiogéniques (Figure 5 [3] et [4]). Après que les cellules endothéliales se soient suffisamment divisées, la monocouche de cellules endothéliales va former une structure en forme de tube (Figure 5 [5] et [6]). La maturation de ces nouveaux vaisseaux sanguins en vaisseaux fonctionnels et stables (Figure 5 [9]) requiert le recrutement de cellules murales (les péricytes pour la microvasculature, les cellules musculaires lisses pour les vaisseaux plus larges) afin de couvrir étroitement la surface abluminale de l'endothélium (Figure 5 [7] et [8]) (Carmeliet,

2003) ; les vaisseaux non recouverts par les cellules murales régressent. Le flux sanguin est alors établi dans le nouveau vaisseau (Jussila et Alitalo, 2002 ; Papetti et Herman, 2002).

2. Médiateurs positifs de l'angiogenèse

De nombreuses substances organiques sont capables d'interagir pour favoriser la néo-vascularisation. Deux facteurs sont particulièrement bien connus, le VEGF et le bFGF.

2.1. Le VEGF

Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire ou VEGF, encore appelé VPF (pour facteur de perméabilité vasculaire) peut être sécrété par la tumeur. Il a un pouvoir mitogène spécifique sur les cellules endothéliales in vitro et un fort pouvoir angiogénique in vivo (Liu et al., 1995 ; Jussila et Alitalo, 2002 ; Gupta et Qin 2003a). Des niveaux élevés de ce facteur sont produits là où l'angiogenèse est requise, comme dans les tissus fœtaux, le placenta, ainsi que dans la plupart des tumeurs humaines (Papetti et Herman, 2002).

Les récepteurs au VEGF, VEGFR-1 (ou FLT₁ pour fms-like tyrosine kinase), VEGFR-2 (ou KDR pour kinase domain containing receptor) et VEGFR-3, font partie de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase (Figure 6). Une fois que le VEGF se lie à son récepteur, il y a dimérisation et auto-phosphorylation du récepteur, ce qui stimule les voies de transmission du signal.

2.2. Le bFGF

Le facteur de croissance fibroblastique basique (bFGF) est également impliqué dans l'angiogenèse. Il exerce un effet mitogène puissant sur les cellules endothéliales et recrute les cellules inflammatoires produisant des facteurs angiogéniques. Le bFGF est synthétisé par les fibroblastes, les cellules endothéliales et les muscles lisses.

3. La néoangiogenèse tumorale

Il est aujourd'hui admis que la majorité des cellules ont besoin d'oxygène pour survivre. Dans le but d'assurer un apport systémique en oxygène, des systèmes respiratoire, vasculaire et circulatoire assurent la capture et la distribution de l'oxygène vers l'ensemble des cellules de l'organisme.

Les cellules tumorales requièrent elles aussi un approvisionnement en oxygène et en nutriment adéquat pour que les processus métaboliques se produisent et que la survie cellulaire soit maintenue. La proximité d'un approvisionnement vasculaire remplit ces exigences chez les cellules et les tissus normaux. Les cellules tumorales, par contre, peuvent induire leur propre approvisionnement en sang à partir de la vasculature préexistante dans un processus qui mime l'angiogenèse normale (Papetti et Herman, 2002). En effet, les cellules au centre d'une tumeur ayant un volume supérieur à 1 mm³ sont privées de l'apport en oxygène et leur environnement devient hypoxique (Figure 7). Ces cellules activent alors le facteur de transcription nommé HIF-1 pour *Hypoxia-Inducible Factor-1* (voir point I.2.). Quand il se lie à l'ADN au niveau de sa séquence consensus HRE, HIF-1 augmente l'expression de plusieurs gènes cible permettant l'adaptation des cellules à l'hypoxie ; un de ces gènes est celui codant pour le VEGF. Ce VEGF entraîne la migration et la prolifération des cellules endothéliales, ce qui permettra la mise en place d'un nouveau réseau de vaisseaux sanguins (Figure 7).

Ce phénomène appelé néovascularisation permet d'apporter l'oxygène à une zone hypoxique (Carmeliet, 2003).

4. La vascularisation tumorale (Figures 8 et 9)

Bien que les vaisseaux sanguins induits par les tumeurs forment des conduits pour la distribution des métabolites, ils sont structurellement anormaux. La plupart de ces vaisseaux fuient et sont immatures. Ceci est partiellement dû au fait que les péricytes et les cellules musculaires lisses sont généralement faiblement recrutés au niveau des tumeurs (Figure 8). Ces vaisseaux irriguant les tumeurs sont constitués de plusieurs couches, ils subissent un remodelage constant, ils sont dilatés et sinueux, ils ne possèdent pas certains récepteurs physiologiques, enfin, ils sont exceptionnellement perméables en raison de la présence de fenestrations, de trous trans- et intercellulaires, et du manque d'une membrane basale complète. Il est à remarquer qu'occasionnellement, certaines cellules endothéliales dans les vaisseaux tumoraux sont remplacées par des cellules tumorales, formant ainsi des vaisseaux sanguins mosaïques (Jussila et Alitalo, 2002 ; Papetti et Herman, 2002 ; Bergers et Benjamin, 2003 ; Vaupel et Harrison, 2004) (Figure 9).

III. Hypoxie Intermittente

L'hypoxie tumorale a tout d'abord été interprétée comme étant une conséquence de la distance entre les cellules et les vaisseaux nourriciers. Cette image de l'hypoxie dite chronique appelée également « hypoxie liée à la limitation de diffusion de l'oxygène » a longtemps été la seule à prévaloir.

Dans les années 1980, ce schéma classique a été reconsidéré car l'existence de zones hypoxiques à proximité immédiate des vaisseaux a été visualisée grâce à différentes méthodes comme l'injection de colorants. Cette hypoxie, appelée intermittente ou transitoire, est liée à une occlusion temporaire des vaisseaux suite aux diverses anomalies structurales que ceux-ci présentent au niveau des tumeurs (voir paragraphe II.4.) (Figure 10). Les cellules sont alors alternativement oxygénées puis soumises à une hypoxie. La durée de ces collapsus vasculaires reste mal connue.

Dans les modèles expérimentaux, les tumeurs prolifèrent plus rapidement que les vaisseaux, la micro-circulation est ainsi rapidement perturbée. La perfusion de la tumeur est alors diminuée au fur et à mesure de sa croissance. Cela entraîne une diminution de l'oxygénation tumorale, et par conséquent le développement de nécroses. Le métabolisme de la tumeur et la concentration en oxygène étant interdépendants, plus ce métabolisme est intense plus l'oxygène disponible est faible si le débit sanguin est insuffisant (Jain, 2001).

Ce nouveau concept a eu des conséquences importantes pour le développement de nouvelles thérapies anti-cancéreuses, comme par exemple la thérapie anti-néovasculaire discutée brièvement dans le chapitre suivant.

IV. Thérapies anti-angiogéniques

1. Introduction

En 1971, Folkman a été le premier à établir un lien entre l'angiogenèse et le développement des tumeurs. Selon lui, sans apport d'oxygène en son centre, une tumeur ne peut croître que de quelques millimètres. Pour se développer, les tumeurs dépendent donc de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins qui viendront les irriguer. Comme nous l'avons mentionné précédemment, ces néo-vaisseaux permettent à la tumeur de se « brancher » sur la circulation générale et d'obtenir ainsi les éléments nutritifs indispensables à sa croissance. Ils vont également fournir aux cellules cancéreuses une voie de dissémination des métastases (Deplanque et Harris, 2000 ; Shimizu et Oku, 2004). C'est sur base de ces observations que Folkman a émis l'idée que bloquer l'angiogenèse pourrait être une nouvelle stratégie pour la thérapie anti-cancéreuse.

La plupart des tumeurs commencent leur croissance comme nodules avasculaires, puis, suite au switch angiogénique, ces tumeurs deviennent vascularisées.

Phase avasculaire

Pendant la phase avasculaire, la croissance tumorale est faible, la tumeur est dormante, vivotante ; par conséquent la tumeur est petite et difficilement détectable car elle n'engendre quasiment pas de symptômes. Il existe à ce stade un état d'équilibre dynamique entre prolifération et mort cellulaire par apoptose (Bergers et Benjamin, 2003).

Ce stade est caractérisé par une instabilité génétique, c'est-à-dire qu'il y a des dysfonctionnements au niveau des points de contrôle de la réplication de l'ADN. Ceci se traduit par exemple par des mutations au niveau de Ras et de p53. Les mutations dans Ras peuvent rendre ce dernier constitutivement actif, ce qui oblige les cellules à se diviser continuellement. Tandis que les mutations dans p53 engendrent une résistance à l'apoptose. Un déséquilibre vers un accroissement du nombre de cellules s'installe alors.

L'absence de vaisseau à proximité de cette tumeur en pleine croissance provoque le switch angiogénique, qui se manifeste par l'activation du facteur de transcription HIF-1, la transcription du gène codant pour le VEGF, et enfin la formation de nouveaux vaisseaux sanguins prêts à irriguer la tumeur ; nous passons donc d'un stade avasculaire à un stade vasculaire.

Phase vasculaire

Les tumeurs qui ont provoqué une néo-vascularisation sont caractérisées par une taille importante ; leur diagnostic est donc facilité par la présence de divers symptômes comme la compression tissulaire. Ces tumeurs vascularisées peuvent envahir les tissus localement mais aussi métastaser (Deplanque et Harris, 2000). La néo-vascularisation permet les échanges de nutriments, d'oxygène, ainsi que l'évacuation des déchets cellulaires (Gupta et Qin 2003a).

L'hypothèse de Folkman revient à dire qu'en inhibant le switch angiogénique, la tumeur reste bloquée à son stade avasculaire, et est donc maintenue dormante, vivotante. Plusieurs acteurs moléculaires impliqués dans ce switch sont donc des cibles potentielles

d'approches anti-angiogéniques. Certaines d'entre elles sont présentées brièvement ci-dessous.

2. Exemples de thérapies anti-angiogéniques

2.1. Les inhibiteurs des facteurs pro-angiogéniques

L'activation des cellules endothéliales est initiée par la liaison des facteurs pro-angiogéniques (comme le VEGF, le bFGF, le PDGF, ...) à leurs récepteurs exprimés sur les cellules endothéliales, puis par la transduction du signal angiogénique dans la cellule. Donc, le blocage de la liaison de ces facteurs à leurs récepteurs devrait inhiber l'angiogenèse. Par exemple, l'utilisation d'anticorps contre le VEGF ou contre le récepteur au VEGF (KDR) inhibe efficacement l'angiogenèse et supprime la croissance tumorale. Ces inhibiteurs bloquent de manière compétitive la liaison d'un ligand à son récepteur et empêche la signalisation qui s'ensuit, comme la phosphorylation des récepteurs à tyrosine kinase. Ces inhibiteurs amplifient également les effets thérapeutiques des agents anti-cancéreux. En effet, quand des agents anti-cancéreux sont administrés avec l'anticorps anti-KDR chez des souris portant une tumeur, la croissance tumorale est efficacement supprimée en comparaison avec le traitement des agents anti-cancéreux seuls ou avec l'anticorps seul, en raison des effets de synergie de la destruction des cellules tumorales et de l'inhibition de l'angiogenèse (Shimizu et Oku, 2004).

2.2. Les inhibiteurs angiogéniques endogènes

En condition physiologique, l'angiogenèse est strictement contrôlée par un équilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques. Ainsi, si les facteurs anti-angiogéniques deviennent prédominants au site angiogénique, l'angiogenèse peut-être facilement supprimée. L'angiostatine est un inhibiteur endogène de l'angiogenèse, issu de la protéolyse du plasminogène. Elle est sécrétée par les cellules tumorales, elle inhibe la migration des cellules endothéliales et induit leur mort par apoptose. Le mécanisme anti-angiogénique de l'angiostatine n'a pas encore été entièrement élucidé, mais il est connu que l'angiostatine lie l'ATP synthase, l'angiotensine, et l'annexine II (Shimizu et Oku, 2004).

L'endostatine est également un inhibiteur endogène de l'angiogenèse. Il s'agit d'un fragment du collagène XVIII qui inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Deplanque et Harris, 2000 ; Shimizu et Oku, 2004).

La thrombospondine-1 (TSP-1) est une glycoprotéine de la matrice extracellulaire sécrétée par divers types cellulaires. TSP-1 inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales en inhibant l'activation de la métalloprotéinase-9 matricielle (MMP-9) et la mobilisation du VEGF hors de la matrice extracellulaire qui s'ensuit (McCarty et al., 2003 ; Shimizu et Oku, 2004).

L'utilisation d'endostatine ou d'angiostatine chez les souris porteuses de tumeurs a effectivement permis de réduire la masse de ces tumeurs (Claesson-Welsh et al., 1998 ; Hajitou et al., 2002). Cependant, leur utilisation chez l'homme n'a pas donné les résultats escomptés.

2.3. Les inhibiteurs des métalloprotéinases matricielles

Les métalloprotéinases matricielles (MMP) jouent un rôle important dans les métastases et l'angiogenèse tumorale. En effet, les MMP, comme les MMP-2 et -9, sont produites par les cellules tumorales, stromales et endothéliales afin de digérer les composants de la matrice extracellulaire, ce qui permet l'invasion par les cellules endothéliales et tumorales (Deplanque et Harris, 2000). Donc, l'inhibition des MMP ou de leur activation pourrait supprimer la migration et l'invasion des cellules tumorales et endothéliales, ce qui inhiberait l'angiogenèse et empêcherait donc la dissémination des métastases par invasion des vaisseaux sanguins (Shimizu et Oku, 2004). Les résultats obtenus in vivo par exemple avec le Batimastat restent cependant décevants (Maquoi et al., 2004), probablement parce qu'il y a une redondance d'activité avec d'autres protéases.

2.4. Les bloqueurs des intégrines

Les intégrines sont des protéines membranaires hétérodimériques composées de chaînes α et β et jouent le rôle de molécules d'adhésion. Dans l'angiogenèse, les intégrines médient l'interaction entre les cellules endothéliales et la matrice extracellulaire, et contrôlent l'adhérence des cellules endothéliales. Les intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ sont exprimées de manière importante sur les cellules endothéliales angiogéniques et jouent un rôle primordial dans l'angiogenèse tumorale (McCarty et al., 2003). La Vitaxine (LM609) est un anticorps contre l'intégrine $\alpha\beta3$ qui inhibe l'angiogenèse induite par le bFGF et induit l'apoptose des cellules endothéliales (Deplanque et Harris, 2000 ; McCarty et al., 2003 ; Shimizu et Oku, 2004). Cet anticorps est actuellement en essais cliniques chez l'homme.

2.5. D'autres inhibiteurs de l'angiogenèse

Récemment, des inhibiteurs encore plus spécifiques de la signalisation de l'angiogenèse ont été développés : SU5416 et SU6668 empêchent la phosphorylation du récepteur au VEGF (KDR), alors que l'Iressa inhibe celle du récepteur au bFGF (Ciardiello et al., 2001). En bloquant cette signalisation, les deux inhibiteurs suppriment les étapes angiogéniques comme la prolifération et la migration des cellules endothéliales, ce qui résulte en la suppression de la croissance tumorale (Shimizu et Oku, 2004). L'Iressa est maintenant disponible commercialement et recommandé dans le traitement des cancers du sein.

La thalidomide est un inhibiteur potentiel de l'angiogenèse en doses limitées (car elle possède aussi des propriétés tératogènes). Elle inhibe la formation de tubes et l'angiogenèse induite par le bFGF et par le VEGF, et supprime ainsi la croissance tumorale de manière efficace (Deplanque et Harris, 2000 ; Shimizu et Oku, 2004).

3. Avantages des approches anti-angiogéniques

Par rapport aux radio- et chimiothérapies, ces nouvelles approches anti-néoangiogéniques semblent très prometteuses. En effet, par rapport à celles-ci, elles présentent de nombreux avantages :

Ces approches sont très sélectives car chez l'adulte, il n'y a que très peu de néoangiogenèse dans les tissus sains (lors des cycles menstruels, lors de la cicatrisation des blessures, pendant la grossesse) et donc peu de cellules endothéliales en migration/prolifération (Shimizu et Oku, 2004).

Le problème de chimiorésistance sera moindre. En effet, les cellules tumorales présentent une instabilité génétique importante et surexpriment ainsi des MDR (pour Multi Drug Resistance) ; ces dernières sont des ATPases expulsant les petites molécules hydrophobes (par exemple les molécules de chimiothérapie). Cependant, les cibles visées par les approches anti-angiogéniques ne sont pas les cellules tumorales mais bien les cellules endothéliales qui, elles, sont stables génétiquement et n'expriment pas les MDR. Elles n'acquerront donc pas de résistance.

La thérapie anti-angiogénique n'engendre pas les effets indésirables sévères rencontrés lors de l'utilisation des drogues anti-cancéreuses cytotoxiques car elles ne ciblent pas les cellules en prolifération (Shimizu et Oku, 2004).

Les approches anti-angiogéniques offrent un effet d'amplification : la mort de quelques cellules endothéliales va affecter tout le territoire tumoral irrigué par cette portion de capillaire (Shimizu et Oku, 2004).

Un autre avantage est que l'accessibilité des cellules endothéliales pour le médicament est très supérieure à l'accessibilité des cellules tumorales car elles sont directement en contact avec le sang.

Enfin, cette approche est non seulement applicable à quasiment toutes les tumeurs solides, mais également aux leucémies.

Cependant, malgré toutes ces caractéristiques, les expériences réalisées chez l'homme ont été décevantes.

4. Des expériences quelque peu décevantes

Lorsque les expériences sont réalisées chez la souris, on implante une xénogreffe de cellules tumorales et il se forme rapidement une tumeur vascularisée d'environ deux centimètres de diamètre. Cependant, ces vaisseaux sanguins présentent diverses anomalies (expliquées au point II.4.). Les approches anti-angiogéniques permettent dans ce cas-ci une stabilisation et une régression de la tumeur car les cellules endothéliales de ces vaisseaux sont fort sensibles à une inhibition de leur prolifération ou de leur migration. Ces premiers résultats positifs étaient très encourageants.

Cependant, chez l'homme, cette approche n'a pas tenu les espoirs escomptés. En effet, chez l'homme, il faut plusieurs mois, voire des années avant qu'une tumeur atteignent un diamètre d'environ deux centimètres. La vascularisation tumorale y est donc constituée de vaisseaux immatures et instables mais également d'un grand nombre de vaisseaux matures et stables. Or les approches anti-angiogéniques visent à supprimer les vaisseaux instables et immatures, elles ne sont donc pas très efficaces chez l'homme.

La solution serait de combiner plusieurs thérapies anti-cancéreuses pour agir aussi au niveau des vaisseaux matures et stables (combiner les approches anti-angiogéniques à la radiothérapie et à la chimiothérapie). En effet, réduire le débit sanguin tumoral peut limiter la croissance de la tumeur, mais surtout, cette approche qui augmente l'hypoxie tumorale peut être combinée à l'utilisation de cytotoxines actives uniquement en milieu hypoxique. Pour la même raison, on peut envisager d'utiliser cette approche en combinaison avec des stratégies

de thérapie génique utilisant l'hypoxie pour favoriser l'expression d'un gène toxique, ou utilisant des protéines à tropisme anaérobie comme vecteur pour une drogue cytotoxique.

5. La thérapie anti-néovasculaire

Les thérapies anti-angiogéniques traditionnelles sont basées sur l'inhibition de la cascade angiogénique telle que la liaison de facteurs pro-angiogéniques à leurs récepteurs, la transduction du signal, la migration et la prolifération des cellules endothéliales, et la formation de tubes. Cependant, il n'est pas certain que le blocage d'une étape de la cascade puisse complètement inhiber l'angiogenèse, et qu'une telle inhibition puisse mener à la régression subséquente de la tumeur.

La thérapie anti-néovasculaire est une nouvelle chimiothérapie ciblant les cellules endothéliales angiogéniques. Etant donné que ces cellules prolifèrent durant l'angiogenèse, elles sont sensibles aux agents anti-cancéreux. La thérapie anti-néovasculaire est catégorisée dans les thérapies anti-angiogéniques, mais est différente des thérapies anti-angiogéniques traditionnelles car cette thérapie élimine les cellules endothéliales proliférantes ainsi que les cellules tumorales en empêchant complètement l'apport sanguin aux tissus tumoraux, ce qui résulte en la régression des tumeurs (Shimizu et Oku, 2004). L'efficacité de cette approche reste cependant à être démontrée.

La plupart des molécules citées ci-dessus induisent la mort des cellules endothéliales par apoptose, prévenant ainsi la néo-vascularisation tumorale. Nous allons donc introduire plus amplement le processus de l'apoptose dans le chapitre suivant.

V. L'apoptose

1. Introduction

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus physiologique par lequel des cellules surnuméraires ou dysfonctionnelles disparaissent de l'organisme. Elle peut être initiée par différents signaux comme la privation d'un facteur de croissance, l'infection de la cellule par un virus, ou des dommages induits à l'ADN.

L'apoptose joue un rôle important dans l'embryogenèse, dans les changements morphologiques, dans l'homéostasie cellulaire, dans l'atrophie et la réparation des tissus et dans la régression des tumeurs. Ces phénomènes résultent d'un équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire (Kerr et al., 1972 ; Wyllie, 1987). Le dérèglement de la mort cellulaire par apoptose est impliqué dans certaines pathologies : dans la plupart des tumeurs, la mort par apoptose est inhibée et le taux de prolifération excède celui de mort cellulaire, ce qui conduit au grossissement du nodule tumoral. Au contraire, une mort excessive des cellules neuronales s'observe dans certaines maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, et la chorée de Huntington (Thompson, 1995).

2. Caractéristiques morphologiques et biochimiques des cellules en apoptose

La mort cellulaire par apoptose est caractérisée par une séquence d'altérations morphologiques comprenant une condensation du cytoplasme et du noyau, un bourgeonnement de la membrane plasmique et, typiquement, une fragmentation en vésicules entourées d'une membrane (les corps apoptotiques) (Figure 11).

Ces transformations visibles sont accompagnées de divers changements biochimiques. Les changements à la surface cellulaire incluent l'externalisation de la phosphatidylsérine membranaire et d'autres altérations qui permettent la reconnaissance par les phagocytes, ce qui permettra aux corps apoptotiques d'être éliminés sans induire l'inflammation (Figure 11). Les changements intracellulaires incluent le clivage de polypeptides cellulaires spécifiques, ainsi que la dégradation de l'ADN génomique entre les nucléosomes pour générer des fragments de longueur correspondant à des multiples entiers de 180 paires de base. Cette activité spécifique permet d'observer, après migration de l'ADN génomique sur gel d'agarose, une échelle d'ADN caractéristique d'une cellule en apoptose permettant de la distinguer d'une cellule en nécrose dans laquelle la fragmentation se fera de façon aléatoire (Sakahira et al., 1998 ; Enari et al., 1998 ; Earnshaw et al., 1999 ; Hengartner, 2000 ; Reed, 2000).

3. Acteurs moléculaires principaux de l'apoptose

3.1. Les caspases

Les caspases (cysteinyll aspartate-specific proteases) sont des membres de la famille des cystéines protéases activées spécifiquement dans les cellules apoptotiques ; elles sont impliquées dans une série de clivages qui résultent en l'initiation et l'exécution de l'apoptose. Une douzaine de caspases ont été identifiées chez les humains ; à peu près deux tiers de celles-ci sont fonctionnelles dans l'apoptose (Hengartner, 2000).

3.1.1. Structure des caspases

Toutes les caspases ont une structure conservée et sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs ou zymogènes. Ces derniers sont composés de trois domaines : un pro-domaine de taille et de séquence variables, localisé dans la partie amino-terminale de la protéine, un domaine de 20 kDa (la grande sous-unité), situé au milieu de la molécule, et un domaine de 10 kDa (la petite sous-unité), localisé dans la partie carboxy-terminale (Figure 12). Bien que la grande sous-unité contienne le domaine catalytique, son activité nécessite la liaison à la petite sous-unité. En effet, l'enzyme mature est un hétérotétramère formé par l'association de deux grandes et deux petites sous-unités, avec deux sites actifs par molécule (Hengartner, 2000 ; Reed, 2000) (Figure 12).

Les caspases sont activées par un clivage protéolytique de la forme zymogène entre les domaines de 20 kDa et de 10 kDa, et entre le pro-domaine et le domaine de 20 kDa. Tous ces clivages se produisent à des sites Asp-Xxx (juste après le résidu aspartate) ; les quatre résidus amino-terminaux du site de clivage sont spécifiques des substrats des caspases (Hengartner, 2000) (Figure 12).

3.1.2. Les différentes classes de caspases et leur activation

Les caspases peuvent être classées en deux groupes, les caspases initiatrices (les caspases-2, -8, -9, et -10) possédant un long pro-domaine et les caspases effectrices (les caspases-3, -6, -7, et -14) avec un pro-domaine court (Figure 12).

La forme zymogène des caspases initiatrices n'est pas complètement inactive mais possède plutôt une très faible activité protéase. Quand elles sont positionnées les unes à proximité des autres par des interactions entre protéines, ces pro-caspases peuvent se cliver l'une l'autre, ce qui produit des caspases entièrement actives. Ces dernières sont, par la suite, capables d'activer les caspases effectrices (Reed, 2000).

Deux voies d'activation des caspases ont été élucidées.

La première se base sur les récepteurs de mort comme TNFR et Fas (Reed, 2000) (Figure 13) :

L'induction de l'apoptose via ces récepteurs provoque le recrutement de plusieurs pro-caspases-8, au niveau d'un complexe formé par les récepteurs de mort. Cette proximité induite des pro-caspases-8 va leur permettre de se cliver l'une l'autre en caspases-8 actives (caspases initiatrices) et d'activer leurs substrats ou d'autres caspases (comme la caspase-3), formant alors une cascade enzymatique permettant d'amplifier et d'intégrer les signaux pro-apoptotiques (Earnshaw et al., 1999 ; Reed, 2000) (Figure 13).

La deuxième voie d'activation des caspases peut être induite par la libération de cytochrome c hors de la mitochondrie. Ce phénomène est induit par divers stimuli incluant le clivage de Bid, ou une élévation dans le niveau des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl2 formant des pores, comme Bax. Dans le cas de Bid, les caspases-8 actives peuvent cliver cette protéine cytosolique en un fragment tronqué, tBid. Ce fragment transloque dans la mitochondrie, ce qui résulte en la libération du cytochrome c (Gross et al., 1999 ; Earnshaw et al., 1999 ; Reed, 2000 ; Hengartner et al., 2000) (Figure 13). Dans le cytosol et en présence de dATP, le cytochrome c forme un complexe avec Apaf-1 et l'active. Apaf-1 actif se lie aux caspases en aval, comme la pro-caspase-9, et les transforme en formes protéolytiquement actives (Figure 13). Ceci est le départ d'une cascade de caspases résultant en l'apoptose (Reed, 2000 ; Gupta, 2003b).

La différence dans ces deux voies d'activation des caspases est liée à la présence de motifs d'interactions protéines-protéines différents, tels que les domaines DED pour «Death Effector Domain» (caspase-8 et -10) ou CARD pour «Caspase Recruitment Domain» (caspase-1, -2, -4 et -9) au niveau du pro-domaine.

3.1.3. Principaux substrats des caspases et conséquences de leur clivage

Plusieurs substrats des caspases ont été identifiés et l'un des mécanismes les plus étudiés est l'activation des nucléases conduisant à la fragmentation de l'ADN. Ces nucléases portant le nom de CAD pour «caspase activated-DNase» existent dans la cellule sous forme de complexe inactif parce qu'elles sont complexées à une sous-unité inhibitrice, ICAD. L'activation de ces endonucléases se produit pendant l'apoptose par clivage de la sous-unité inhibitrice par la caspase-3 (Figure 13). L'endonucléase ainsi libérée va couper l'ADN génomique entre les nucléosomes pour générer des fragments de longueur correspondant à des multiples entiers de 180 paires de bases. La présence de cette échelle d'ADN est utilisée comme un des marqueurs de mort cellulaire apoptotique (Hengartner, 2000 ; Samejima et al., 2001 ; Debatin, 2004).

D'autres événements comme le clivage des lamines nucléaires par les caspases expliquent la condensation et le bourgeonnement nucléaire observés au cours de l'apoptose (Buendia et al., 1999 ; Hengartner, 2000) (Figure 11). En effet, les lamines sont des protéines intra-nucléaires qui maintiennent la forme du noyau et qui permettent l'interaction entre la chromatine et l'enveloppe nucléaire.

La perte de la morphologie cellulaire et l'apparition de bourgeonnements membranaires est probablement la conséquence du clivage de protéines du cytosquelette comme la fodrine, la gelsoline, et l'actine (Kothakota et al., 1997 ; Hengartner, 2000) (Figure 11).

Un autre substrat très étudié est la poly (ADP-ribose) polymérase ou PARP. Cette protéine enzymatique est constituée d'un domaine amino-terminal responsable de la liaison à l'ADN, un domaine central, et un domaine carboxy-terminal responsable de son activité catalytique. Dans des conditions normales, l'enzyme inactive réside dans le nucléoplasme et, en réponse à des lésions sur l'ADN, PARP est recrutée. Elle devient active en se liant à l'ADN et permet alors la réparation de l'ADN en synthétisant de longs polymères d'ADP-ribose. Elle fait partie de la superfamille des enzymes utilisant le NAD⁺ (nicotinamide adénine dinucléotide) comme substrat pour le transfert de l'ADP-ribose. Pendant l'apoptose, PARP est clivée par des protéases telles que les caspases-3, -7 ou -9, ce qui sépare le domaine de liaison à l'ADN du domaine catalytique (D'Amours et al., 1999). Le domaine de liaison à l'ADN peut par conséquent, en se fixant sur l'ADN, empêcher toute autre réparation (qui serait inutile en condition d'apoptose).

3.2. Les membres de la famille Bcl-2

3.2.1. Structure des membres de la famille Bcl-2

Cette famille inclut à la fois des molécules pro- et anti-apoptotiques : Bcl-2 et Bcl-X_L sont les membres anti-apoptotiques les plus importants, et leur fonction peut être régulée par des interactions avec des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, comme Bad et Bax (Oltvai et al., 1993).

Les membres de la famille Bcl-2 sont des régulateurs de l'apoptose possédant jusqu'à quatre domaines d'homologie Bcl-2 (BH) conservés. Ces domaines BH désignés BH1, BH2, BH3, BH4 correspondent à des segments d'hélice- α (Adams et Cory, 1998 ; Kelekar et Thompson, 1998 ; Reed, 1998) (Figure 14).

Les régions BH1, 2 et 3 forment la poche hydrophobe capable de lier un domaine BH3 appartenant à une protéine pro-apoptotique. Ceci permet d'inhiber la fonction d'initiation de l'apoptose des protéines pro-apoptotiques (Gross et al., 1999).

Les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 comme Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1, et Boo présentent une conservation de séquence des quatre domaines. Par contre, les membres pro-apoptotiques n'ont pas de domaine BH4. Ils se divisent en deux sous-groupes, ceux qui possèdent les trois domaines (BH1, 2 et 3) comme Bax, Bak, Bok/Mtd et ceux qui possèdent uniquement le domaine BH3 comme Bid, Bad, Bim,... encore appelés « BH3-only proteins » ; la région BH3 semble être fortement impliquée dans l'activité pro-apoptotique (Figure 14).

3.2.2. Localisation des membres de la famille Bcl-2

La majeure partie des protéines de la famille Bcl-2 (surtout les anti-apoptotiques) est constitutivement localisée au niveau des membranes mitochondriales. Ainsi, la plupart des membres de la famille Bcl-2 comme Bcl-2 et Bcl-X_L possèdent un domaine carboxy-terminal hydrophobe de 20 acides aminés permettant leur ancrage dans la membrane mitochondriale externe mais aussi au niveau du réticulum endoplasmique et du noyau (Krajewski et al., 1993) (Figure 14). Par contre, une partie importante des membres pro-apoptotiques se situe au niveau du cytosol ou du cytosquelette avant le signal de mort. Après ce signal, les membres pro-apoptotiques subissent un changement conformationnel qui les rend aptes à cibler et à s'intégrer dans les membranes, et spécialement au niveau de la membrane mitochondriale externe (Gross et al., 1999). Les protéines pro-apoptotiques Bid, Bim et Bad ne possèdent pas le domaine transmembranaire C-terminal d'ancrage mitochondrial. Ces protéines se situent normalement dans le cytosol mais migrent vers la mitochondrie après la perception du signal pro-apoptotique.

3.2.3. Interactions entre les membres de la famille Bcl-2

La plupart des membres pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 ont la capacité de former aussi bien des homodimères que des hétérodimères. Cela suggère que la régulation de l'apoptose par ces protéines résulte d'un équilibre du niveau d'expression respectif des protéines pro- et anti-apoptotiques, les cellules exprimant plus de protéines pro-apoptotiques seront sensibles à la mort, les autres seront résistantes (Hengartner, 2000).

La fonction principale de ces régulateurs est de contrôler la libération de facteurs pro-apoptotiques, comme le cytochrome c, de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytosol (Hengartner, 2000).

4. Rôle de la mitochondrie dans l'apoptose

4.1. Généralités

Les mitochondries sont délimitées par deux membranes, une interne et une externe, séparées par un espace intermembranaire. La membrane externe contient des porines qui permettent le passage de molécules ayant un poids moléculaire inférieur à 10 kDa, du cytosol vers l'espace intermembranaire et vice-versa. La membrane interne est très peu perméable aux petits ions à cause d'une forte teneur en cardiolipine. La matrice constitue le volume interne de la mitochondrie délimité par la membrane interne.

La mitochondrie joue un rôle vital dans la cellule en produisant une grande partie de l'énergie dont la cellule a besoin, en participant à l'homéostasie calcique, et en maintenant le potentiel redox et le pH intracellulaire. Ceci signifie qu'un dysfonctionnement majeur de la mitochondrie peut entraîner la mort cellulaire. Pendant l'apoptose, de l'eau et différents solutés pénètrent dans la mitochondrie provoquant son gonflement et la libération des différents constituants de l'espace intermembranaire dans le cytosol ; les constituants de la matrice sont retenus dans la mitochondrie parce que la membrane interne reste intacte.

4.2. Mécanismes de libération du cytochrome c

L'activation des caspases nécessite la présence du cytochrome c au niveau du cytosol afin de former l'apoptosome. Le cytochrome c se trouve dans l'espace intermembranaire dans une cellule au repos. Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer la libération de solutés de la mitochondrie vers le cytosol, étape correspondant à la phase effectrice de l'apoptose (Figure 15).

4.2.1. La théorie de la rupture de la membrane externe mitochondriale (Figure 15a)

Le premier modèle implique une hyperpolarisation de la membrane interne qui résulterait en l'incapacité de l'échange entre l'ADP cytosolique et l'ATP mitochondrial (Vander Heiden et al., 1999). Une telle augmentation du potentiel membranaire mitochondrial peut être à l'origine du gonflement osmotique de la matrice conduisant à la rupture de la membrane externe mitochondriale. Cette rupture permettrait la libération du cytochrome c ainsi que d'autres protéines intermembranaires dans le cytosol (Hengartner, 2000).

4.2.2. Le pore de transition de perméabilité membranaire

Le premier modèle décrit est en opposition avec un deuxième modèle impliquant un méga-canal, le pore de transition de perméabilité membranaire ou PTP. Ce PTP est un canal non sélectif pouvant être formé par l'apposition de protéines transmembranaires résidant au niveau de la membrane interne et au niveau de la membrane externe de la mitochondrie (Crompton, 1999). Les différentes études réalisées montrent que ce pore est principalement formé par l'association du transporteur de nucléotide adénylique ou ANT, du canal anionique dépendant du voltage ou VDAC et de la cyclophiline D, une protéine de la matrice (Figure 15b). Etant donné que la taille du pore de ce canal est trop petite pour permettre aux protéines de le traverser, ce modèle doit supposer que VDAC et ANT subissent un changement de conformation en se liant par exemple aux membres de la famille Bcl-2. Ces derniers peuvent en effet réguler l'ouverture du pore : Bcl-2 peut prévenir cette ouverture (Kroemer et al., 1997 ; Shimizu et al., 1999) alors que Bax provoque une chute du potentiel membranaire

mitochondrial et en favorise l'ouverture (Marzo et al., 1998 ; Gross et al., 1999 ; Hengartner, 2000) (Figure 15d).

4.2.3. La théorie du pore formé par les membres de la famille Bcl-2 (Figure 15c)

Un dernier mécanisme tente d'expliquer la libération de solutés de la mitochondrie vers le cytosol. Il s'agirait ici d'un canal qui pourrait être formé par certains membres de la famille Bcl-2 compte tenu de la forte homologie de Bcl-X_L avec la sous-unité de la toxine diphtérique, capable de former un pore membranaire. Il a été suggéré que les protéines de la famille Bcl-2 comme Bax pouvaient s'insérer, après changement conformationnel, au niveau de la membrane externe mitochondriale. En effet, ces protéines peuvent s'insérer dans les bicouches lipidiques, s'oligomériser et former des canaux. Ces canaux sont dépendants du pH, du voltage et révèlent une faible sélectivité ionique. Ils permettraient alors directement le passage du cytochrome c vers le cytosol (Schlesinger et al., 1997 ; Hengartner, 2000).

4.3. La voie mitochondriale d'initiation de l'apoptose

La voie mitochondriale est utilisée en réponse à différents stimuli comme la privation de facteurs de croissance ou de cytokines, les stress induisant des dommages à l'ADN (comme les irradiations gamma et les ultraviolets), ... et peut être caractérisée par la libération du cytochrome c à partir de la mitochondrie (Figure 16).

4.3.1. Le cytochrome c

Le cytochrome c est codé par un gène nucléaire et est synthétisé sous forme de précurseur incapable de participer à l'induction de l'apoptose. Le précurseur est importé dans la mitochondrie où il subit une maturation. La protéine devenue globulaire se lie à un hème grâce à la cytochrome c lyase. Le cytochrome c est séquestré au niveau de l'espace intermembranaire mitochondrial où il exerce sa fonction physiologique de transporteur d'électrons entre les complexes III et IV de la chaîne respiratoire (Ravagnan et al., 2002). Il est désormais établi que le cytochrome c, libéré dans le cytosol, est à l'origine de la formation de l'apoptosome.

4.3.2. La protéine Apaf-1

Apaf-1 est une protéine d'environ 130 kDa comprenant entre autre un domaine CARD dans la partie amino-terminale, et un domaine C-terminal impliqué dans les interactions protéines-protéines. Le domaine CARD d'Apaf-1 n'est pas exposé dans des conditions normales et ne peut donc pas interagir avec la caspase-9 ; en revanche en présence d'ATP et du cytochrome c, Apaf-1 change de conformation et peut interagir avec la caspase-9 grâce à l'exposition de CARD (Li et al., 1997) (Figure 16).

4.3.3. La formation de l'apoptosome

L'apoptosome impliqué dans l'apoptose induite par la mitochondrie est constitué d'Apaf-1, du cytochrome c et de la pro-caspase-9, il s'agit donc d'un complexe protéique d'une taille importante (700 kDa) (Figure 16). Apaf-1 s'associe à la pro-caspase-9 et à deux molécules de cytochrome c (Cain et al., 2001). Le cytochrome c facilite la liaison de l'ATP à Apaf-1 probablement en favorisant l'exposition du domaine de liaison par changement de la

conformation d'Apaf-1. L'oligomérisation d'Apaf-1 est un événement rapide et l'apoptosome formé semble stable.

4.4. Régulation des voies dépendantes des caspases

4.4.1. Les protéines inhibitrices de l'apoptose ou IAPs

Les IAPs sont des protéines qui inhibent la mort cellulaire en empêchant le clivage des caspases (Fesik et Shi, 2001) (Figure 16). Elles permettent l'inhibition directe des caspases-3 et -7 et l'inhibition de l'activation de la caspase-9 (Ekert et al., 2001). Les IAPs doivent donc être inhibés lorsque l'apoptose est initiée.

4.4.2. Les inhibiteurs des IAPs

Smac/DIABLO («Second Mitochondria-derived Activator of Caspase / Direct IAP Binding protein with Low pI») est une protéine bloquant l'activité anti-apoptotique des IAPs (Verhagen et al., 2000) (Figure 16). La protéine Smac/DIABLO est synthétisée dans le cytoplasme sous forme d'un précurseur et est importée dans la mitochondrie grâce à un signal de localisation mitochondrial (MLS) situé du côté N-terminal. Une fois dans ce nouveau compartiment, le signal de localisation est clivé et la protéine acquiert son activité pro-apoptotique en formant des homodimères (Chai et al., 2000). Sa libération de la mitochondrie est induite par de nombreux stimuli apoptotiques et est contrôlée par les membres de la famille Bcl-2 (Adrain et al., 2001) ; elle se passe en même temps que celle du cytochrome c et permet l'activation des caspases par inhibition des IAPs.

4.4.3. La protéine AIF

Le facteur d'induction apoptotique (AIF) est une flavoprotéine possédant entre autre une séquence de localisation mitochondriale et deux séquences de localisation nucléaire. Après exposition de la cellule à un stimulus pro-apoptotique, AIF transloque de l'espace intermembranaire vers le cytosol puis vers le noyau. Ce phénomène précède généralement la libération du cytochrome c. Une fois dans le noyau, AIF provoque une condensation périphérique de la chromatine et une fragmentation de l'ADN générant des fragments d'ADN de haut poids moléculaire (et non pas une fragmentation internucléosomique comme celle induite par CAD) (Figure 16).

5. Les différentes voies d'initiation de l'apoptose

L'apoptose est un moyen d'éliminer les cellules non nécessaires, âgées ou endommagées et est régulée par l'effet réciproque de protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. L'abondance relative des protéines anti- et pro-apoptotiques détermine la susceptibilité de la cellule à programmer la mort. Il existe deux voies majeures induisant l'apoptose : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque. Bien que différentes, ces deux voies aboutissent toutes deux à l'activation de la cascade des caspases.

5.1. La voie des récepteurs de mort ou voie extrinsèque

Les ligands, membres de la famille du TNF (Tumor Necrosis Factor), jouent un rôle important dans la prolifération cellulaire, la différenciation, l'apoptose, la modulation de la réponse immunitaire et l'induction de l'inflammation (Pitti et al., 1996). Ces ligands sont

produits sous forme de trimères et se lient à des récepteurs de la famille du récepteur au TNF (TNFR). Ces derniers sont des protéines transmembranaires caractérisées par un motif extracellulaire riche en cystéines (pour la liaison au ligand) et un domaine de mort «DD» («Death Domain») intracellulaire. La mort cellulaire initiée par ces ligands requiert la trimérisation des récepteurs.

Tous les ligands membres de la famille du TNF n'induisent pas la mort cellulaire. La mort induite par les membres de la famille des récepteurs au TNF conduit à l'activation de caspases et en est dépendante (Longthorne et Williams, 1997).

5.1.1. La voie FasL/Fas

La glycoprotéine Fas est un récepteur transmembranaire exprimé à la surface de nombreux types cellulaires. Suite à la liaison du ligand FasL, le récepteur de mort Fas trimérise et facilite la liaison de molécules adaptatrices, FADD pour «Fas Associated Death Domain», par des interactions homotypiques entre les motifs «DD» localisés du côté C-terminal des deux polypeptides (Figure 17A). FADD possède également en plus de son «DD» un domaine effecteur de mort «DED» («Death Effector Domain») localisé du côté N-terminal lui permettant de lier la pro-caspase-8 ou la pro-caspase-10. La formation de ce complexe appelé DISC pour «Death-inducing Signaling Complex» initie l'activation enzymatique de l'apoptose. La caspase active est libérée du complexe et va activer d'autres pro-caspases comme la pro-caspase-3, caspase effectrice de l'apoptose induisant l'activation de différents substrats à l'origine des modifications cellulaires caractéristiques de l'apoptose (Earnshaw et al., 1999 ; Reed, 2000 ; Hengartner et al., 2000 ; Gupta, 2003b) (Figure 17A).

5.1.2. La voie TNF-TNF-R

Le TNF- α est sécrété principalement par les macrophages et les lymphocytes activés en réponse à une infection. Ce facteur agit en se liant aux récepteurs de type 1 et 2 (TNF-R1 et TNF-R2) et active plusieurs voies de signalisation. Les deux récepteurs sont des récepteurs transmembranaires qui diffèrent par leur partie cytoplasmique, TNF-R1 possédant un domaine «DD» contrairement à TNF-R2. Ces deux récepteurs peuvent induire un signal de survie cellulaire mais TNF-R1 peut également provoquer un signal de mort par son domaine «DD». La liaison du TNF à son récepteur peut aussi bien conduire à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 (anti-apoptotiques) qu'à l'apoptose (Hsu et al., 1995) (Figure 17B).

La fixation du TNF- α provoque une trimérisation de TNF-R1 permettant la liaison de la protéine adaptatrice TRADD pour «TNF-R Associated Death Domain». Celle-ci va à son tour recruter FADD par son «DD». De la même façon que lors de l'apoptose induite par le récepteur Fas, la caspase-8 ou -10 va être activée par le complexe TNF-R1/TRADD/ FADD afin d'agir sur les caspases effectrices -3, -6 et -7 (Figure 17B).

5.1.3. Amplification de la voie des récepteurs de mort

La voie des récepteurs de mort se produit dans les cellules exprimant la pro-caspase-8 de façon importante, mais dans les autres types cellulaires, cette voie doit être amplifiée par la voie mitochondriale grâce au clivage de la protéine Bid par la caspase-8 en un fragment tronqué, tBid (Figure 17). Ce dernier transloque rapidement du cytosol vers la membrane mitochondriale d'une façon similaire à celle de l'association d'un ligand à son récepteur

(Wang et al., 1996). Les protéines assimilées à des récepteurs pourraient être les protéines Bax ou Bcl-2. La liaison de Bid à de telles protéines provoque la libération du cytochrome c induisant l'activation de la caspase-9 puis de la caspase-3, comme décrit ci-dessus.

5.2. La voie mitochondriale ou voie intrinsèque

La voie mitochondriale d'initiation de l'apoptose, expliquée au point 4.3., peut être activée par différents stimuli comme la privation de facteurs de croissance et les stress induisant des dégâts dans l'ADN.

5.2.1. La privation de facteurs de croissance

Certains facteurs de croissance sont des facteurs de survie ; leur présence inhibe la mort cellulaire par apoptose. Lors de la liaison des facteurs de croissance à leur récepteur (Figure 13), ces derniers subissent une trans-phosphorylation au niveau de leur domaine tyrosine kinase. Cette phosphorylation va induire la phosphorylation de la kinase Akt via l'activation de la PI3K (phosphatidyl inositol 3-phosphate kinase). Akt va ensuite phosphoryler la protéine pro-apoptotique Bad. Une fois phosphorylée, la protéine Bad ne peut pas agir car elle est séquestrée dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3 (Figure 13). En absence de facteurs de croissance, Akt n'est pas activée, Bad n'est donc pas phosphorylé ni séquestré. Bad va alors remplir son rôle pro-apoptotique en s'associant à Bcl-2 au niveau de la mitochondrie et induire ainsi la libération du cytochrome c.

5.2.2. Les dommages à l'ADN

L'apoptose peut être également déclenchée par les dommages à l'ADN. Ces dommages peuvent être induits par une augmentation de la production de radicaux libres, par des rayonnements ultraviolets, par la présence de molécules cytotoxiques, ...

Un groupe des kinases, appelées ATM, est impliqué dans la reconnaissance des dommages à l'ADN en ce sens qu'elles peuvent se fixer au niveau des brins d'ADN libres (Smith et al., 1999). L'activité de ces kinases va mener à la phosphorylation de la protéine p53. En condition normale, p53 est dégradé par le protéasome car ubiquitinylé par une E3 ubiquitine ligase spécifique, Mdm2. Par contre, lorsqu'il est phosphorylé, p53 n'interagit plus avec Mdm2, il est donc stabilisé mais aussi activé et augmente l'expression de p21, ce qui bloque le cycle cellulaire et permet à la cellule de réparer son ADN. Cependant, la phosphorylation de p53 provoque également l'augmentation de l'expression de la protéine Bax et d'autres protéines pro-apoptotiques, ce qui favorise la formation d'homodimères pro-apoptotiques au niveau de la mitochondrie. Par conséquent, il y a libération du cytochrome c et induction de l'apoptose (Dragovich et al., 1998).

Dans le cadre de ce mémoire, le modèle d'induction de l'apoptose étudié est celui déclenché par l'étoposide. Cette molécule inhibe la topoisomérase-II, une enzyme impliquée dans la réplication de l'ADN. Le rôle de cette enzyme est de couper les deux brins d'ADN, de les dénouer et de les religuer par la suite. En présence d'étoposide, la topoisomérase-II n'est plus capable de religuer l'ADN précédemment découpé ; ces dommages engendrés à l'ADN sont rapidement perçus par la cellule et vont conduire à l'activation de p53. Il s'ensuit alors de l'arrêt du cycle cellulaire avec réparation ou diminution des dégâts, ou bien si les dommages sont trop conséquents, la mort cellulaire par apoptose.

Objectifs

Dans les années '70, les progrès des connaissances scientifiques sur l'angiogenèse tumorale ont conduit à croire que les thérapies anti-angiogéniques offriraient une nouvelle voie d'approche pour maîtriser la croissance tumorale chez les patients atteints de cancer.

Depuis lors, ces thérapies, qui semblaient prometteuses dans les modèles in vitro et chez la souris, se sont révélées décevantes lorsqu'elles ont été testées chez les patients. Une des raisons possibles serait que l'hypoxie ou l'hypoxie intermittente influencerait les effets de ces thérapies. En effet, à cause des anomalies de structures qu'ils présentent au niveau des tumeurs, les vaisseaux sanguins n'assurent pas un flux sanguin continu.

Il a été démontré au laboratoire que l'hypoxie chronique protège les cellules HepG2 (cellules d'hépatome humain) de l'apoptose induite par l'étoposide. Dans le but de voir si l'hypoxie (chronique ou intermittente) interfère également avec les effets de la thérapie anti-angiogénique, deux approches ont été développées au cours de ce mémoire. La première a été tout d'abord de vérifier si l'hypoxie chronique protège également les cellules endothéliales EAhy926 de l'apoptose induite par l'étoposide, et ensuite de voir si l'hypoxie intermittente apporte une meilleure protection que l'hypoxie chronique contre l'apoptose. La deuxième approche visait à mettre en évidence des changements d'expression génique induits dans les cellules endothéliales par les conditions d'hypoxie chronique ou intermittente. L'influence de certains de ces changements sur la résistance ou la sensibilité des cellules endothéliales à l'apoptose a également été étudiée.

Matériel et Méthodes

I. Culture Cellulaire

Le modèle cellulaire utilisé au cours de ce mémoire est la lignée humaine EAhy926. Il s'agit d'une lignée permanente obtenue à partir de la fusion entre des cellules HUVEC, cellules endothéliales humaines de cordon ombilical et des cellules de la lignée permanente A549, issues d'un carcinome pulmonaire humain (Edgell et al., 1983).

1. Matériel

- PBS stérile (Phosphate Buffer Saline : 0,9% NaCl, 10mM KH_2PO_4 , pH 7,4) ;
- Trypsine-EDTA : solution de trypsine à 0,5 g/l et EDTA à 0,2 g/l préparée dans une solution de Puck (Gibco, UK) ;
- Tube 10 ml (Sterilin, UK) ;
- Boîte de culture de 75 cm^2 (T75) (Costar, Corning, USA) ;
- Milieu de culture complet :
 - Milieu DMEM contenant 4,5 g/l de glucose (Invitrogen),
 - Antibiotiques : Pénicilline (50 U/ml) (BioWhittaker Europe, Belgique)
Streptomycine (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (BioWhittaker Europe, Belgique),
 - 10% de sérum de veau fœtal (Gibco).

2. Méthode

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de culture T75 contenant 15 ml de milieu de culture complet (20 ml pour le week-end) et placées dans une étuve à 37°C (5% CO_2 , 95% air atmosphérique, 90% hygrométrie). Les cellules sont repiquées trois fois par semaine selon le protocole suivant.

Le milieu de culture est décanté et les cellules sont rincées avec 4 ml de PBS stérile. Une fois, le milieu de rinçage décanté, 2 ml de solution Trypsine-EDTA stérile sont ajoutés afin de détacher les cellules. Après environ deux minutes, l'action de la trypsine-EDTA est stoppée par l'ajout de 5 ml de milieu de culture complet stérile. La suspension cellulaire est alors transvasée dans un tube de 10 ml puis centrifugée quatre minutes à 1000 rpm. Le surnageant est ensuite décanté et le culot est resuspendu dans du milieu de culture complet stérile. La suspension cellulaire est alors répartie, éventuellement après comptage à l'aide d'une cellule de Neubauer (Marenfield), dans des nouvelles boîtes de culture (T75 ou T25) ou dans des plaques multi-puits (Costar), contenant le volume adéquat de milieu de culture complet. Les boîtes sont alors placées dans l'étuve à 37°C et à 5% de CO_2 .

II. Incubation sous hypoxie

1. Matériel

- Milieu CO_2 -indépendant complet :
 - Milieu CO_2 -indépendant (Gibco, UK),
 - 36 mg de L-Glutamine (Sigma, USA) pour 500 ml de milieu,
 - Antibiotiques : Pénicilline (50 U/ml) (BioWhittaker Europe, Belgique)
Streptomycine (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (BioWhittaker Europe, Belgique) ;
- Etoposide (Merck, Allemagne) ;
- SP600125 (20 mM), JNK inhibitor (Anthra [1,9-cd] pyrazol-6(2H)-one) (BIOMOL Research Laboratories, Plymouth Meeting, PA).

2. Méthode

Lors des expériences en condition d'hypoxie chronique, le milieu de culture des cellules est remplacé par du milieu CO₂-indépendant complet : 500 µl/puits pour les plaques 24 puits, 4 ml/T25, et 10 ml/T75. Les boîtes sont ensuite ouvertes et placées dans un incubateur à 37°C (99% d'azote et 1% d'oxygène) pendant 7 heures ou 16 heures. Des boîtes subissant les mêmes conditions sont incubées en condition d'hypoxie intermittente. La mise en hypoxie intermittente se fait de manière identique à la mise en hypoxie chronique à part que les cellules subissent une réoxygénation de 30 minutes toutes les heures (durant 7 heures) (Figure 1). Des boîtes contrôles sont également incubées dans les mêmes conditions mais en normoxie (atmosphère normale).

Les différents traitements appliqués aux cellules durant la mise en hypoxie sont l'induction de l'apoptose par l'ajout d'étoposide à 150 µM, et l'inhibition de la Jun N-terminale kinase par l'ajout de SP600125 à 20 µM.

III. Dosage de l'activité des caspases en fluorescence

1. Principe

Durant l'apoptose, les caspases sont activées et peuvent dès lors cliver leurs substrats à des sites Asp-Xxx (juste après le résidu aspartate). Le kit « Homogeneous caspases assay, fluorimetric » de Roche permet de déterminer si les cellules sont en cours d'apoptose en mesurant l'activité des caspases-2,-3,-6,-7,-8,-9 et -10. Ce test consiste à mettre les caspases en présence d'un substrat (DEVD-R110 [Asp-Glu-Val-Asp-Rhodamine 110]). Si les caspases sont activées, elles sont capables de cliver ce substrat. La quantité de Rhodamine 110 libre est proportionnelle à l'activité des caspases et peut être mesurée à l'aide d'un fluorimètre.

2. Matériel

- Homogeneous caspases assay, fluorimetric (Roche, Allemagne)

3. Méthode

Après 7 heures ou 16 heures d'incubation, le milieu des puits est décanté et 100 µl de substrat dilué 10x dans l'« incubation buffer » sont ajoutés dans les puits durant 30 minutes, à 37°C et à l'abri de la lumière afin de permettre la lyse des cellules. Une fois les cellules lysées, le substrat est accessible aux caspases et est donc clivé par celles-ci. La rhodamine libre est ensuite détectée au fluorimètre ($\lambda_{\text{excitation}}$: 485 nm ; $\lambda_{\text{émission}}$: 520 nm).

IV. Dosage de l'activité des caspases en luminescence

1. Principe

Le kit « Caspase-Glo 3/7 Assay » de Promega est un test luminescent qui permet de déterminer si les cellules sont en cours d'apoptose en mesurant l'activité des caspases-3 et -7. Ce test consiste à mettre les caspases en présence du substrat caspase-3/7 proluminescent (Z-DEVD-aminoluciférine). Si les caspases sont activées, elles sont capables de cliver ce substrat ; le substrat de la luciférase (l'aminoluciférine) est alors libéré, permet la réaction de la luciférase et provoque donc la production de lumière. La luminescence observée est proportionnelle à la quantité de l'activité caspase présente et peut être mesurée à l'aide d'un luminomètre.

2. Matériel

- Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega, USA);
- Plaque 96 puits opaque.

3. Méthode

Après 7 heures ou 16 heures d'incubation, le milieu des puits est décanté et 100 µl de substrat Caspase-Glo 3/7 resuspendu dans le « tampon Caspase Glo 3/7 » sont ajoutés dans les puits durant 10 minutes, à 37°C, à l'abri de la lumière, et sur plaque tournante, afin d'aider la lyse des cellules. Une fois les cellules lysées, le substrat est accessible aux caspases et est donc clivé par celles-ci. Les 100 µl du mélange substrat-tampon sont ensuite récupérés dans une plaque 96 puits opaque et la lumière émise par le substrat est détectée au luminomètre.

V. ELISA Caspase-3 Active

1. Principe

Durant la phase d'initiation de l'apoptose, les caspases sont activées et peuvent dès lors cliver leurs substrats à des sites Asp-Xxx (juste après le résidu aspartate).

La mesure de l'activation des caspases se réalise à l'aide d'un inhibiteur de caspases biotinylé (biotine-ZVDK-fmk) qui se fixe de manière covalente au niveau de la grosse sous-unité de la caspase-3 lorsqu'elle a été activée. Ajouté au milieu cellulaire, cet inhibiteur pénètre dans les cellules et forme un lien thio-éther stable avec la cystéine du site actif des caspases-3 actives uniquement. Après la lyse des cellules, le lysat cellulaire est ajouté dans les puits d'une plaque multi-puits coâtée avec un anticorps monoclonal spécifique de la caspase-3. Les caspases-3 actives sont ensuite détectées au moyen d'un complexe streptavidine-peroxydase et de son substrat.

2. Matériel

- Human active caspase-3 Immunoassay (R&D Systems, Allemagne) ;
- Diméthylsulfoxyde (DMSO) (Merck, Allemagne) ;
- Solution de rinçage : PBS (Phosphate Buffer Saline) ;
- Extraction buffer (10 ml) :
 - 3,6 g d'urée (Merck, Allemagne),
 - 2 ml d' « extraction buffer » concentré,
 - 400 µl d'inhibiteurs de protéases 1x (PIC) (à partir de Complete Protease Inhibitor Cocktail tablets 25x) (Roche, Allemagne),
 - porter à 10 ml avec de l'eau distillée.

3. Préparation des extraits

Les 400 grammes d'inhibiteur de caspase-3 sont tout d'abord reconstitués dans 92 µl de DMSO. A la fin des incubations, 250 µl du milieu de culture (CO₂-indépendant) sont enlevés de chaque puits et 1 µl de l'inhibiteur des caspases (biotine-ZVDK-fmk) est ajouté aux 250 µl de milieu restant. Après une incubation d'1 heure à 37°C, la plaque 24 puits est posée sur glace et le contenu de chaque puits est transféré dans un Eppendorf. Les puits sont ensuite rincés dans 1 ml de PBS et ce dernier est ensuite ajouté à l'Eppendorf correspondant. Une centrifugation de 3 minutes à 2000 rpm permet de récupérer les cellules détachées ; le surnageant est ensuite éliminé. 70 µl de tampon d'extraction sont placés dans les puits et « splashés » sur les cellules ; ils sont ensuite transférés dans les Eppendorfs contenant les

culots. Après avoir été vortexés, ces Eppendorfs sont laissés 2 heures à température ambiante puis congelés à -20°C.

4. Dosage

Les 70 µl d'échantillon doivent être dilués dans 370 µl de RD5-20 qui est d'abord dilué 5x dans l'eau. Le RD5-20 sert également à reconstituer l'active-caspase-3 standard. Ce standard sert à étalonner les valeurs finales obtenues pour les échantillons. Pour ce faire, le standard de départ, à une concentration de 20 ng/ml, est dilué pour obtenir une échelle de concentrations (20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.62, 0.31 ng/ml). Toutes ces dilutions sont réalisées dans le RD5-20.

100 µl d'échantillon ou de standard sont incubés pendant 2 heures à température ambiante dans les puits d'une plaque 96 puits coatée avec des anticorps anti-caspase-3. Ensuite, 4 rinçages de 300 µl sont effectués avec le « wash buffer » dilué 25x. Après les rinçages, 100 µl d'« active caspase-3 conjugate » dilués dans du « conjugate diluent » sont ajoutés dans les puits. Après 1 heure d'incubation, 4 rinçages de 300 µl sont effectués avec le « wash buffer » avant de mettre 100 µl de solution de substrat. Cette solution est préparée juste avant son emploi en mélangeant un même volume de solution 1 et de solution 2. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, la réaction est arrêtée par l'ajout de 100 µl de solution stop. L'absorbance est ensuite mesurée à 450 nm avec une correction à 570 nm. L'intensité de la couleur mesurée est proportionnelle à la quantité de caspase-3 active et une courbe d'étalonnage est réalisée à partir des dilutions du standard.

VI. Western Blot

1. Principe

La technique du Western blot permet de mettre en évidence, dans un extrait cellulaire, le niveau d'expression d'une protéine selon les différentes conditions expérimentales testées. Les protéines sont tout d'abord séparées du lysat cellulaire en fonction de leur poids moléculaire grâce à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de PVDF (PolyVinylidène DiFluoride). La protéine d'intérêt est alors détectée à l'aide d'un anticorps primaire spécifiquement dirigé contre l'un de ses épitopes, puis par un anticorps secondaire reconnaissant le fragment Fc des anticorps, couplé à un système de révélation.

2. Matériel

Pour le lysat cellulaire total :

- Tampon de lyse (2x) :
 - Tris 40 mM pH 7,5 (Merck, Allemagne),
 - KCl 150 mM (Merck, Allemagne),
 - EDTA 1 mM (Merck, Allemagne);
- Triton X-100 1% (Sigma, USA) ;
- Inhibiteurs de protéases 1x (à partir de Complete Protease Inhibitor Cocktail tablets 25x) (PIC) (Roche, Allemagne) ;
- Inhibiteurs de phosphatases 1x (à partir de Phosphatase Inhibitor Buffer 25x) (PIB) :
 - NaVO₃ 25 mM (Sigma, USA),
 - PNPP (para-nitrophényl phosphate) 250 mM (Sigma, USA),
 - α-glycérophosphate 250 mM (Sigma, USA),
 - NaF 125 mM (Merck, Allemagne).

Pour le dosage des protéines par la méthode de Bradford :

- Colorant Bio-Rad protein Assay 5x (Bio-Rad, USA) ;
- Etalon BSA (Bovine Serum Albumin) (2 µg/µl).

Pour la préparation des échantillons :

- Bleu de charge concentré 5x (Tableau 1).

Pour l'électrophorèse :

- Gel séparateur d'acrylamide (Tableaux 2, 3, 4) ;
- Gel concentrateur (Tableaux 5, 6, 7) ;
- Tampon d'électrophorèse (Tableau 8) ;
- Cuve d'électrophorèse (modèle V15-17, Life technologies, GibcoBRL, USA) ;
- Etalon de poids moléculaire : Seeblue plus 2 (Invitrogen, USA) ;
- Générateur (Bio-Rad Power PAC 300).

Pour le transfert :

- Appareil de transfert : Hoeffer Semiphor (Amersham Biosciences, USA);
- Papier Whatman (Merck, Allemagne);
- Membrane PVDF (Amersham, UK);
- Tampon de transfert (Tableau 9).

Pour le traitement de la membrane, l'incubation avec les anticorps et la révélation :

- Tampon de rinçage : TBS-Tween 0,1%, pH 7,6 (1 l) (TBS-T) :
 - 2,42g de NaCl (Mercks, Allemagne),
 - 8 g de Tris (Mercks, Allemagne),
 - 1 ml de Tween (Sigma, USA);
- Anticorps primaires et anticorps secondaires (Tableau 10) ;
- Agent bloquant (poudre de lait dégraissé, CDK1075, Amersham, UK) ;
- Substrat de révélation : ECL Advance Western Blotting Detection Kit (Amersham, USA);
- Films radiographiques (Amersham, USA) ;
- Solutions de révélation et de fixation (Ilford 2000RT Imaging, USA).

3. Lysat cellulaire total

Après incubation en hypoxie ou en normoxie, les boîtes de culture T25 sont placées sur glace, décantées, et 200 µl de tampon de lyse froid y sont ajoutés. Le tapis cellulaire est ensuite raclé et le lysat cellulaire est transféré dans un Eppendorf placé sur glace. Les échantillons sont finalement centrifugés à 4°C pendant 5 minutes à 13 000 rpm, afin de récupérer les protéines dans le surnageant. 10 µl de ce dernier sont gardés à -20°C pour réaliser un dosage protéique, deux autres aliquots de 120 µl sont conservés à -70°C.

4. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Le but de cette méthode est d'estimer la quantité de protéines dans chaque échantillon, afin de pouvoir charger des quantités équivalentes de protéines sur le gel du Western Blot.

4 µl d'extraits protéiques sont placés de minute en minute dans 1 ml de colorant Bradford dilué 5x et filtré. 5 minutes après l'ajout de l'extrait, une lecture de la densité optique (DO) est réalisée à 595nm à l'aide d'un spectrophotomètre mis à zéro avec de l'eau. Afin de normaliser les valeurs, différents contrôles doivent également être mesurés comme le tampon de lyse (blanc échantillon), un étalon et de l'eau (blanc étalon). Tous les dosages sont réalisés en dupliquats. La formule suivante est utilisée afin de calculer la concentration en protéines présente dans les échantillons :

$$\frac{([Moyenne DO_{\text{échantillon}} - Moyenne DO_{\text{blanc échantillon}}] / [Moyenne DO_{\text{étalon}} - Moyenne DO_{\text{blanc étalon}}]) \times 5}{\text{Volume d'échantillon}} = \mu\text{g de protéines}/\mu\text{l}$$

5. Préparation des échantillons

Un volume d'échantillon correspondant à 30 µg de protéines est prélevé et porté à 40 µl avec de l'eau distillée. On ajoute ensuite 10 µl de bleu de charge qui est ainsi dilué 5x. Enfin, les protéines sont dénaturées à 100°C pendant 5 minutes avant d'être centrifugées brièvement et d'être chargées sur le gel.

6. Electrophorèse

Après avoir monté les plaques de verre ensemble, le gel séparateur est coulé entre celles-ci (environ 1 cm en dessous du peigne). Afin que le gel séparateur ne se craquelle pas durant sa polymérisation et que sa surface soit bien homogène, 1 ml d'isobutanol saturé en eau est déposé sur la surface du gel durant le temps de sa polymérisation (1 heure).

L'isobutanol est ensuite éliminé et la surface du gel est rincée à l'eau distillée ; une couche d'eau distillée est posée en surface du gel pour la nuit. Le lendemain, l'eau est enlevée et l'excès d'eau est absorbé à l'aide d'un papier Whatman. Le gel concentrateur est ensuite coulé jusqu'au bord des plaques et le peigne est inséré entre les deux plaques.

Lorsque le gel concentrateur est polymérisé (environ 45 minutes), le peigne est délicatement enlevé et les plaques sont placées dans la cuve d'électrophorèse avec le tampon d'électrophorèse. Enfin, les échantillons sont chargés dans les puits ainsi qu'un étalon de poids moléculaire, on les laisse migrer dans le gel concentrateur pendant 1 heure à 35 mA et puis dans le gel séparateur pendant environ 3 heures à 45 mA.

7. Transfert

Une fois la migration des échantillons terminée, le gel est démoulé, puis déposé sur une membrane de PVDF selon un dispositif en sandwich (Figure 2). Ce sandwich est confectionné dans l'appareil de transfert et ses composants sont humidifiés par du tampon de transfert. Un courant de 35 mA est appliqué durant environ 16 heures afin de permettre la migration des protéines sur la membrane.

8. Traitement de la membrane, incubation avec les anticorps et révélation

Après que le transfert des protéines ait été effectué, le sandwich est démoulé. La membrane est récupérée et subit un « blocking » d'1 heure dans du TBS-T contenant 2% de lait Amersham. Ce traitement de la membrane permet la diminution des liaisons aspécifiques des anticorps par saturation de la membrane avec des protéines du lait.

La membrane est ensuite incubée durant 2 heures en présence de l'anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt dilué dans du TBS-T contenant 2% de lait Amersham (Tableau 10). Après cette incubation, la membrane est rincée 3x15 minutes dans du TBS-T avant d'être incubée 45 minutes avec l'anticorps secondaire couplé à la Horseradish Peroxidase (HRP) et dilué dans du TBS-T contenant 2% de lait Amersham. (Tableau 10).

Enfin, trois rinçages de 15 minutes dans du TBS-T sont effectués avant de couvrir la membrane de solution ECL (Enhanced Chemo Luminescent) durant 5 minutes. Lors de la révélation en chambre noire, un film radiographique est appliqué sur la membrane. Il passe ensuite dans différents bains : une solution de révélation, de l'eau, et une solution de fixation ; il est finalement rincé à l'eau courante. L'intensité des bandes révélées sur le film est ensuite quantifiée par analyse d'image à l'aide du logiciel Image Master Total Lab après avoir scanné le film.

VII. Immunofluorescence

1. Principe

Le marquage en immunofluorescence permet de visualiser et de localiser une protéine d'intérêt au sein d'une cellule en utilisant, comme moyen de détection, un anticorps spécifique de la protéine ciblée. Cet anticorps est ensuite détecté à l'aide d'un anticorps anti-immunoglobuline couplé à un fluorochrome qui émet de la fluorescence après excitation à une longueur d'onde déterminée.

2. Matériel

- Plaques 24 puits (Costar, Corning, USA) ;
- Lamelles couvre-objet de 13 mm de diamètre (Vel, Allemagne) ;
- Lames porte-objet de 2,6 x 7,6 cm (Vel, Allemagne) ;
- PBS (Phosphate Buffer Saline) (1 l) :
 - 20 ml tampon phosphate 0,5 M pH 7,4,
 - 9 g NaCl (Merck, Allemagne),
 - Porter à volume avec de l'eau distillée ;
- PBS/BSA : Dissoudre 2 g de BSA (Bovine Serum Albumin fraction V ; pH 5,2) (Sigma, USA) dans 100 ml de PBS ;
- PBS + Triton X-100 1% (T-9284, Sigma, USA) ;
- PBS + 4% PFA (Paraformaldéhyde) (Merck, Allemagne) ;
- Anticorps primaire : Anti-Caspase 3 active (G748A, Promega, USA), dilution 100 x ;
- Anticorps secondaire : Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG antibody (Molecular Probes, USA), dilution 1000x ;
- TOPRO-3 (Molecular Probes, USA) ;
- Mowiol (Cat 32,459-0, Sigma-Aldrich, Allemagne-UK) : milieu de montage ;
- Microscope confocal (Leica, Allemagne).

3. Méthode

Les cellules EAhy926 sontensemencées dans des plaques 24 puits sur des lamelles couvre-objet stérilisées à l'alcool, à une densité de 35 000 cellules par puits. Le lendemain les cellules sont incubées 7 heures en normoxie, ainsi qu'en hypoxie chronique et intermittente, ou 16 heures en normoxie et en hypoxie chronique.

Lorsque les incubations sont terminées, les cellules sont immédiatement fixées pendant 10 minutes avec 300 µl de PBS-paraformaldéhyde 4%. Elles sont ensuite rincées trois fois au PBS avant d'être perméabilisées exactement 3 minutes avec 500 µl de PBS-1% Triton X-100. Les cellules sont à nouveau rincées trois fois avec du PBS-BSA.

30 µl d'anticorps primaire dilué dans du PBS-BSA sont déposés sur un parafilm placé en chambre humide. Les lamelles couvre-objet sorties des puits sont alors retournées sur la goutte d'anticorps. La chambre humide est mise en chambre froide (4°C) pour la nuit. Le lendemain, les lamelles couvre-objet sont remises dans les puits afin de subir trois rinçages dans du PBS-BSA. Ensuite elles sont mises 1 heure à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire dilué dans du PBS-BSA selon le même procédé que pour l'anticorps primaire (mais cette fois-ci à l'abri de la lumière, pour préserver le fluorochrome). Les lamelles couvre-objet sont rincées trois fois au PBS et un marquage des noyaux est effectué. Pour cela, 30 µl de TOPRO-3 dilué 80x dans une solution de RNase (2 mg/ml de PBS) sont déposés sur un parafilm et les lamelles couvre-objet sont retournées dessus pour une durée de 30 minutes à température ambiante, et à l'abri de la lumière, avant d'être à nouveau rincées trois fois dans du PBS.

Finalement, les lamelles couvre-objet sont montées sur des lames porte-objet avec du Mowiol préchauffé à 57°C. Après une nuit à 4°C, les lames pourront être observées au microscope confocal, de manière semi-quantitative, en gardant le photomultiplicateur constant.

VIII. L'apoptochip

1. Principe

Le micro-damier « DualChip human apoptosis » a été conçu pour cibler efficacement les profils d'expression des gènes qui sont impliqués dans la régulation de l'apoptose. Ce damier couvre 123 gènes marqueurs humains importants (en triplicats) qui permettent d'évaluer les réponses cellulaires à des stress induisant l'apoptose.

Cette technique se déroule en 3 étapes. Tout d'abord, l'ARN total est extrait des cellules incubées dans différentes conditions. La concentration en ARN et sa pureté sont mesurées au spectrophotomètre, et l'intégrité de cet ARN est vérifiée à l'aide de l'Agilent 2100 Bioanalyser et RNA 6000 LabChip Kit (Figure 3). La deuxième étape consiste en la rétrotranscription de l'ARNm en ADNc avec incorporation de nucléotides biotinylés. Finalement, après avoir été hybridés sur le micro-damier, les ADNc sont détectés et quantifiés à l'aide d'un scanner laser confocal (ScanArray 4000XL[PerkinElmer Life Sciences]).

2. Matériel

Pour l'extraction d'ARN total :

- RNAgents Total RNA Isolation System (Promega, USA) ;
- Phénol/Chloroforme/isoamyl alcool (125 : 24 : 1 , pH 4,7) (Promega, USA) ;
- Ethanol (Merck, Allemagne) ;
- Nuclease-free water (Promega, USA).

Pour la reverse transcription :

- RNAsin Ribonuclease inhibitor (Promega, USA);
- Ribonuclease H (Gibco, UK);
- RNase-free water (Promega, USA);
- Oligo-dT (Gibco, UK);
- Mix dNTP (composition voir Tableau 11);
- Internal Standard mix (DualChip Microarrays, Eppendorf, Allemagne) ;
- Buffer RT 5x (Invitrogen, USA);
- Superscript II (Invitrogen, USA).

3. Extraction d'ARN total

Cette étape de la manipulation se réalise dans un environnement « RNase free » afin d'éviter toute possibilité de dégradation de l'ARN. Après incubation, les boîtes de culture T75 sont posées sur glace, décantées, et le tapis cellulaire est raclé dans 600 µl de tampon de dénaturation à 4°C. Le lysat cellulaire est ensuite transféré dans un Eppendorf sur glace. 60µl d'acétate de sodium 2 M et 600 µl de phénol/chloroforme /isoamyl alcool sont ensuite ajoutés successivement dans chaque Eppendorf, et les échantillons sont vortexés. Après une incubation sur glace de 15 minutes et une centrifugation de 15 minutes à 10 000 g et 4°C, la phase aqueuse (phase supérieure contenant l'ARN) est transférée dans un nouvel Eppendorf. 600 µl d'isopropanol sont ajoutés et les tubes sont placés 30 minutes à -20°C afin que l'ARN précipite. Après cette incubation, les échantillons sont centrifugés 10 minutes à 13 000 rpm et 4°C. Le surnageant est ensuite décanté et le culot d'ARN est rincé avec 1 ml d'éthanol 75% à 4°C. Le tout est à nouveau centrifugé 10 minutes à 13 000 rpm et 4°C. Finalement, le

surnageant est décanté et le culot d'ARN est séché à l'air avant d'être resuspendu dans 25 µl d'eau RNase free. 2 µl sont prélevés pour le dosage au spectrophotomètre et le reste est stocké à -70°C.

4. Reverse Transcription avec marquage indirect

2 µg d'ARN total portés à un volume total de 4,5 µl avec de l'eau RNase free sont mélangés à 3 µl de standard interne et à 2 µl d'amorce oligo-dT (500 ng/µl). Après une incubation de 10 minutes à 70°C, les échantillons sont immédiatement incubés sur glace pendant 5 minutes et 9 µl du mélange réactionnel (Tableau 11) sont ajoutés à chaque échantillon. Il s'ensuit alors successivement une incubation de 5 minutes à température ambiante, l'ajout d'1,5 µl de Superscript RII, une incubation d'1h30 à 42°C, l'ajout d'1,5 µl de Superscript RII, une incubation d'1h30 à 42°C, une incubation de 15 minutes à 70°C (ce qui inhibe le Superscript RII), l'ajout d'1 µl de RNase H (pour éliminer les brins d'ARNm toujours liés à l'ADNc), une incubation de 20 minutes à 37°C, et une dénaturation de 3 minutes à 95°C. Les échantillons sont finalement immédiatement congelés à -20°C.

5. Hybridation

L'hybridation des échantillons sur le micro-damier « DualChip human apoptosis » a été effectuée selon le manuel d'instruction DualChip™ (Eppendorf). La réaction d'hybridation a été réalisée à l'aide d'un Thermoblock pour lames DC utilisé avec un Thermomixer comfort (Eppendorf) durant 16 heures à 60°C.

La détection et la quantification des événements d'hybridation ont été réalisées à l'aide d'un scanner laser confocal (ScanArray 4000XL[PerkinElmer Life Sciences]) ; le programme ImaGene® 5.5 (BioDiscovery®) a été utilisé pour la quantification du signal.

IX. Real-time RT PCR

1. Principe

La Real-time RT PCR a pour but la quantification de l'ARNm d'un gène d'intérêt ; cette technique se déroule en trois étapes. Tout d'abord, l'ARN total est extrait des cellules incubées dans différentes conditions. Ensuite, une rétrotranscription de l'ARNm en ADNc est réalisée en utilisant une amorce polyT. Enfin, la PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel est effectuée. Celle-ci consiste en l'amplification exponentielle de l'ADN cible au cours des cycles PCR. C'est à l'aide du SYBR Green, un agent intercalant fluorescent, que nous pouvons visualiser cycle par cycle l'accumulation des amplicons. La quantification repose sur le concept de cycle seuil ou Ct (Cycle threshold). Il représente le cycle PCR au cours duquel la fluorescence émise se distingue du bruit de fond. Le Ct est inversement proportionnel à la quantité d'ADN cible de départ, elle-même proportionnelle à la quantité d'ARNm. L'analyse nécessite de passer par une normalisation par rapport à un « house keeping gene », l'α-tubuline dans notre cas.

2. Matériel

Pour l'extraction d'ARN total : (voir point VIII.2.)

Pour la reverse transcription :

- RNAsin Ribonuclease inhibitor (Promega, USA);
- Ribonuclease H (Gibco, UK);
- RNase-free water (Promega, USA);

- Oligo-dT (Gibco, UK);
- dNTP mix (Eurogentec, Belgique);
- Buffer RT 5x (Invitrogen, USA);
- Superscript II (Invitrogen, USA).

Pour la Real-time PCR :

- Master mix “SYBR Green PCR” (Applied Biosystems, Pays-Bas) ;
- 96-well optical reaction plate (Applied Biosystems, Pays-Bas) ;
- Optical Adhesive Covers (Applied Biosystems, Pays-Bas) ;
- Amorces sens et anti-sens (Applied Biosystems, Pays-Bas) ;
- RNase-free water (Promega, USA) ;
- 7000 sequence detection system (Applied Biosystems, Pays-Bas).

3. Extraction d’ARN total (voir point VIII.3.)

4. Reverse Transcription

Une transcriptase inverse va synthétiser de l’ADNc à partir d’une amorce polyT qui va s’hybrider sur la queue polyA de l’ARNm.

2 µg d’ARN total portés à un volume total de 7,5 µl avec de l’eau RNase free sont mélangés à 2 µl d’amorce oligo-dT et incubés 10 minutes à 70°C. Après cette incubation, les échantillons sont immédiatement placés sur glace durant 5 minutes et 9 µl du mélange réactionnel (4 µl de Buffer RT 5x, 2 µl de DTT 0,1 M, 1 µl de RNasin, et 2 µl de dNTP mix) sont ajoutés à chaque échantillon. Il s’ensuit alors successivement une incubation de 5 minutes à température ambiante, l’ajout d’1,5 µl de Superscript RII, une incubation d’1h30 à 42°C, une incubation de 15 minutes à 70°C (ce qui inhibe le Superscript RII), l’ajout d’1 µl de RNase H (pour éliminer les brins d’ARNm toujours liés à l’ADNc), et une incubation de 20 minutes à 37°C. Les échantillons sont finalement immédiatement congelés à -20°C.

5. Real-time PCR

Pour chaque gène étudié, un mélange (quantité pour un puits) contenant 2,5 µl d’eau distillée, 5µl d’amorce diluée 3x (1/3 de l’amorce sens, 1/3 de l’amorce anti-sens, et 1/3 d’eau distillée), et 12,5 µl de SYBR Green est préparé. 20 µl de ce mélange et 5 µl d’ADNc dilué 100x dans de l’eau RNase free sont placés dans les puits d’une plaque 96 puits spécifiquement conçue pour les PCR. Afin de servir de contrôle négatif, certains puits recevront 20 µl du mélange PCR auxquels seront ajoutés 5 µl d’eau. La plaque 96 puits est ensuite recouverte d’une bande adhésive avant d’être centrifugée quelques secondes. Elle est ensuite placée dans l’appareil qui exécutera une quarantaine de cycles d’amplification et mesurera la fluorescence associée à chacun des puits tout au long de l’amplification.

X. Trans-AM

1. Principe

Le but de cette méthode est la détection de la liaison d’un facteur de transcription à l’ADN. Des plaques 96 puits coatées par des ADN trappeurs attachés au fond du puits par un système biotine-streptavidine sont utilisées. Ces ADN trappeurs possèdent la séquence consensus reconnue par le facteur de transcription étudié. La détection de la liaison du facteur de transcription à l’ADN s’effectue à l’aide d’un anticorps primaire spécifique de ce facteur et d’un anticorps secondaire couplé à la peroxydase.

2. Matériel

Pour l'extraction nucléaire :

- Na_2MoO_4 (Sigma, USA) ;
- NaF (Merck, Allemagne) ;
- Glycérol 87% (Merck, Allemagne) ;
- Solution (Tableau 12) ;
- PIC (Protease Inhibitor Cocktail) (Roche, Allemagne) (voir composition au point VI.2.) ;
- PIB (Phosphatase Inhibitor Buffer) (voir composition au point VI.2.) .

Pour le dosage :

- Plaque 96 puits coâtée avec des trappeurs possédant la séquence de la liaison à l'ADN pour AP-1 ou pour p53 ;
- Solutions (Tableau 13) ;
- Pipette multichannel avec tips Biohit (Finlande) ;
- Anticorps polyclonal de lapin anti-p53 (SC-6243, E0703, Santa Cruz, USA) ;
- Anticorps polyclonal de lapin anti-c-fos (SC-7205, I27i, Santa Cruz, USA) ;
- Anticorps polyclonal de lapin anti-jun (SC-1694, D1803, Santa Cruz, USA) ;
- Anticorps anti-IgG de lapin (SC-2004, K2304, Santa Cruz, USA) ;
- Spectrophotomètre (Ultramarck Microplate Imaging System, Bio-Rad).

3. Extraction nucléaire

Le milieu de culture est décanté et les cellules sont rincées dans 5 ml de PBS froid + 1 mM Na_2MoO_4 + 5 mM NaF. 10 ml de HB 1x sont ajoutés durant exactement 3 minutes à chaque boîte de culture T75 placée sur glace. Le tampon hypotonique fait gonfler les cellules. Après ce temps d'incubation, le HB est décanté et 500 μl de tampon de lyse sont répartis sur les cellules avant de racler le tapis cellulaire et de le transférer dans un Eppendorf sur glace. Après une centrifugation de 30 secondes à 13 000 rpm, le surnageant est décanté et le culot, qui contient les noyaux, est alors resuspendu dans 50 μl de RE complet puis dans 50 μl de SA complet. Après avoir tourné sur roue 30 minutes à 4°C pour extraire les protéines nucléaires, les Eppendorfs sont centrifugés 5 minutes à 13 000 rpm et 4°C. Le surnageant contenant les protéines nucléaires est alors aliquoté et stocké à -70°C, tandis que le culot contenant l'ADN et les débris membranaires est éliminé. Un dosage protéique par la méthode de Bradford est réalisé sur un aliquot pour déterminer la concentration en protéines des échantillons.

4. Dosage de l'activité de liaison du facteur de transcription à sa séquence consensus

30 μl (pour AP1) ou 40 μl (pour p53) de tampon de binding 1x sont placés dans chaque puits. 20 μl (pour AP1) ou 10 μl (pour p53) d'extrait de protéines nucléaires (voir lysat – Tableau 13) sont ajoutés à chaque puits, ce qui permet la liaison du facteur de transcription à sa séquence consensus. L'incubation sous légère agitation et à température ambiante dure 1 heure. Les puits sont ensuite lavés 3 fois avec 200 μl de PBS₅₀-Tween 0,1%. Dans chaque puits, 100 μl d'anticorps primaire (Tableau 13) sont ajoutés afin de reconnaître le facteur de transcription. Après une heure d'incubation à température ambiante, les puits sont lavés 3 fois avec 200 μl de PBS₅₀-Tween 0,1%. 100 μl d'anticorps secondaire couplé à la HRP (Tableau 13) sont alors ajoutés dans chaque puits, et, après une incubation d'1 heure à température ambiante, les puits sont lavés 4 fois avec 200 μl de PBS₅₀-Tween 0,1%. Pour la révélation, 100 μl de TMB (tétra-méthyl benzidine, Biosource) sont placés dans chaque puits. Au terme d'une incubation de 7 minutes (pour AP1) ou de 3 minutes (pour p53) à l'abri de la lumière, 100 μl de solution stop (Biosource) sont ajoutés dans les puits. La densité optique est alors mesurée au spectrophotomètre à 450 nm (référence 655 nm).

Résultats et Discussion

I. Effet de l'hypoxie chronique et de l'hypoxie intermittente sur l'apoptose induite par l'étoposide

L'agent induisant l'apoptose, utilisé lors de ce mémoire, est l'étoposide ; il s'agit d'un dérivé semi-synthétique de la podophyllotoxine qui présente une activité anti-tumorale. L'étoposide inhibe la synthèse d'ADN en formant un complexe avec la topoisomérase II et l'ADN. Ce complexe induit des cassures dans l'ADN double brin et empêche les réparations par la liaison de la topoisomérase-II. L'accumulation des cassures dans l'ADN empêche l'entrée dans la phase mitotique de la division cellulaire, et mène à la mort cellulaire par apoptose. L'étoposide agit principalement dans les phases G2 et S du cycle cellulaire (Damayanthi et Lown, 1998 ; Hande, 1998 ; Meresse et al., 2004).

Les dommages à l'ADN sont perçus par le groupe des kinases ATM qui vont mener à la phosphorylation de la protéine p53. Cette phosphorylation provoque l'augmentation de l'expression de la protéine Bax et d'autres protéines pro-apoptotiques, ce qui favorise la formation d'homodimères pro-apoptotiques au niveau de la mitochondrie, et par conséquent, la libération du cytochrome c. Dans le cytosol et en présence d'ATP, le cytochrome c forme un complexe avec la protéine Apaf-1 et l'active. Apaf-1 actif se lie aux caspases en aval, comme la pro-caspase-9, et les transforme en formes protéolytiquement actives. Ces caspases initiatrices vont à leur tour cliver les caspases effectrices en aval (comme la pro-caspase-3) pour les rendre actives. Activées, ces dernières sont aptes à cliver leur substrat ; celui étudié au cours de ce mémoire est la poly (ADP-ribose) polymérase ou PARP.

La première partie de ce mémoire avait pour but de considérer si, dans le modèle cellulaire étudié, des conditions d'incubation en hypoxie chronique (7 heures et 16 heures) et/ou en hypoxie intermittente (7 heures) pouvaient influencer ce processus menant à l'apoptose. Pour cela, différents paramètres de l'apoptose ont été suivis.

1. Etude de l'activité globale des caspases

Afin de déterminer si les cellules EAhy926 sont en cours d'apoptose, une mesure de l'activité globale des caspases-2, -3, -6, -7, -8, -9 et -10 a été réalisée au moyen d'un test fluorescent.

Pour cela, les cellules EAhy926 ont étéensemencées à une densité de 50 000 cellules par puits d'une plaque 24 puits. Elles ont ensuite été placées en normoxie, en hypoxie chronique ou en hypoxie intermittente, pendant 7 ou 16 heures, en présence ou non d'étoposide à 150 μ M. Une fois les incubations terminées, les cellules ont été lysées, ce qui a permis aux caspases actives de cliver le substrat DEVD-R110 ajouté dans chaque puits. La quantité de Rhodamine 110 libre, proportionnelle à l'activité des caspases, a finalement été mesurée à l'aide d'un fluorimètre. Ce test a également été effectué sur un puits vide ne contenant pas de cellules. La valeur de ce blanc retirée, les résultats sont présentés sous forme de graphique (figure 1).

Analyse des résultats

Les résultats obtenus sont représentés graphiquement à la figure 1. L'étoposide augmente légèrement la quantité des caspases actives dans les cellules et ce d'autant plus que le temps d'incubation est grand. Une protection de l'hypoxie est observée si nous comparons

les conditions de normoxie et d'hypoxie (chronique et intermittente) en présence d'étoposide aussi bien après 7 heures qu'après 16 heures d'incubation. La protection de l'hypoxie intermittente observée est toutefois moins importante que celle apportée par l'hypoxie chronique.

Cette première expérience montre un rôle protecteur de l'hypoxie contre l'apoptose des cellules endothéliales induite par l'étoposide.

2. Evolution de la quantité de la forme clivée de la caspase-9

Afin de confirmer les résultats obtenus, nous avons suivi l'activation d'une caspase initiateur, la caspase-9, et, dans un deuxième temps, nous avons mesuré l'activité des caspases effectrices.

Des expériences de western blot ont été effectuées afin de visualiser l'abondance de la forme clivée de la caspase-9 selon les différentes conditions expérimentales testées. Cette protéine d'intérêt a été détectée à l'aide d'un anticorps primaire spécifiquement dirigé contre un de ses épitopes, puis par un anticorps secondaire reconnaissant le fragment Fc des anticorps, couplé à un système de révélation.

La caspase-9 fait partie des caspases initiateurs de l'apoptose, seule la forme active de cette protéine est détectée lors des expériences de western blot réalisées ici car l'anticorps primaire que nous avons utilisé est spécifique de la forme clivée de la caspase-9.

Analyse des résultats

La figure 2 présente les résultats obtenus pour la détection de la forme active de la caspase-9 en western blot. Nous observons une augmentation de l'abondance de cette forme active en présence d'étoposide. Une diminution de cette activation est observée lorsque les cellules sont incubées en présence d'étoposide en condition d'hypoxie chronique et intermittente 7 heures, comparativement à la condition de normoxie 7 heures. Le niveau protéique est légèrement plus élevé en hypoxie intermittente 7 heures, qu'en hypoxie chronique 7 heures. Par contre, pour des incubations de 16 heures en présence d'étoposide, l'abondance de la forme active de la caspase-9 ne semble pas être différente en hypoxie chronique par rapport à la normoxie.

Cette expérience confirme en partie le rôle protecteur de l'hypoxie contre l'apoptose des cellules endothéliales EAhy926. Tout comme l'avait montré l'expérience précédente, ce western blot indique que l'hypoxie intermittente apporte une protection plus faible contre la mort cellulaire que l'hypoxie chronique.

3. Etude de l'activité des caspases effectrices -3 et -7

Afin de vérifier les résultats obtenus lors de l'expérience précédente, un dosage de l'activité des caspases effectrices a été réalisé.

Ce test a permis d'estimer dans quelle mesure les cellules sont en apoptose en mesurant cette fois l'activité des caspases-3 et -7. Pour cela, les cellules EAhy926 ont étéensemencées à une densité de 50 000 cellules par puits d'une plaque 24 puits. Elles ont ensuite été placées en normoxie, en hypoxie chronique ou en hypoxie intermittente, pendant 7

ou 16 heures, en présence ou non d'étoposide 150 μ M. Une fois les incubations terminées, les cellules ont été lysées, ce qui a permis aux caspases actives de cliver le substrat Z-DEVD-aminoluciférine ajouté dans chaque puits. Le substrat de la luciférase (l'aminoluciférine) ainsi libéré, a permis la réaction de la luciférase et a provoqué la production de lumière. La luminescence émise, proportionnelle à l'activité des caspases, a finalement été mesurée à l'aide d'un luminomètre. Ce test a également été effectué sur un puits vide ne contenant pas de cellules. La valeur de ce blanc retirée, les résultats sont présentés sous forme de graphique (figure 3).

Analyse des résultats

La figure 3 représente graphiquement les résultats obtenus. L'étoposide augmente fortement l'activité des caspases-3 et -7. Cependant, cette activité n'est pas diminuée lorsque les cellules sont incubées en hypoxie chronique et en présence d'étoposide que ce soit après 7 ou 16 heures. Toutefois, l'activité des caspases-3 et -7 est moins importante en hypoxie intermittente en présence d'étoposide.

Ces résultats montrent à nouveau l'induction de l'apoptose par l'étoposide au niveau des cellules endothéliales EAhy926, mais l'effet protecteur de l'hypoxie chronique contre la mort cellulaire n'est pas observé dans ce cas.

4. Etude de l'activation de la caspase-3 induite par l'étoposide

Ce test ELISA permet de mesurer la quantité de caspases-3 actives en ajoutant, aux puits d'une plaque multi-puits coâtée avec un anticorps monoclonal spécifique de la caspase-3, un lysat obtenu à partir de cellules préalablement incubées en présence d'un substrat biotinylé de la caspase-3. Le substrat fixé dans le site actif de l'enzyme est ensuite détecté au moyen d'un complexe streptavidine-peroxydase et du substrat de cette dernière. Ce test a été réalisé afin de confirmer les résultats obtenus lors des expériences précédentes ; il a été effectué sur des cellules EAhy926 repiquées à une densité de 50 000 cellules par puits. Les conditions testées sont identiques à celles considérées lors des expériences précédentes.

Analyse des résultats

L'effet de l'étoposide est bien marqué (figure 4), cependant, la quantité des caspases-3 actives ne diminue pas en conditions d'hypoxie intermittente et chronique en présence d'étoposide (aussi bien après 7 heures d'incubation qu'après 16 heures).

Cette expérience ne confirme donc pas l'effet protecteur observé dans les deux premières expériences.

5. Evolution de la quantité de la forme clivée de la protéine PARP

Des expériences de western blot ont ensuite été effectuées afin de visualiser le degré de clivage d'un substrat des caspases, la protéine PARP, selon les différentes conditions expérimentales testées. Cette protéine d'intérêt a été détectée à l'aide d'un anticorps primaire spécifiquement dirigé contre un de ses épitopes, puis par un anticorps secondaire reconnaissant le fragment Fc des anticorps, couplé à un système de révélation.

Pendant l'apoptose, la poly (ADP-ribose) polymérase, ou PARP, est clivée par des protéases telles que les caspases-3, -7 ou -9, ce qui sépare son domaine de liaison à l'ADN du domaine catalytique. L'anticorps primaire utilisé lors de la révélation de cette protéine ne reconnaît que le fragment clivé de 85 kDa, spécifique d'une situation apoptotique.

Analyse des résultats

Les résultats obtenus pour la détection de la forme clivée de PARP en western blot sont représentés graphiquement à la figure 5. Après une incubation de 7 heures en présence d'étoposide, nous observons une augmentation de l'abondance du fragment de 85 kDa. Une diminution de l'abondance de ce fragment est observée en hypoxie chronique, mais pas en hypoxie intermittente, par rapport à la normoxie en présence d'étoposide. Après 16 heures d'hypoxie chronique en présence d'étoposide, l'abondance du fragment de PARP n'est pas moindre par rapport à la condition de normoxie + étoposide.

Cette expérience montre à nouveau une variabilité dans les effets apportés par l'hypoxie sur l'apoptose induite par l'étoposide.

6. Etude de la localisation subcellulaire de la forme active de la caspase-3

Les expériences réalisées jusqu'à présent suivent l'activation du processus apoptotique du niveau de l'ensemble de la population des cellules. Comme toutes les cellules n'entrent pas en apoptose en même temps (les cellules ne sont en effet pas synchronisées au niveau de leur cycle cellulaire), nous avons voulu suivre le processus apoptotique de manière individualisée afin de mieux caractériser les effets de l'hypoxie.

Des expériences d'immunofluorescence ont donc été réalisées afin de visualiser et de localiser, au sein de chacune des cellules, différentes protéines impliquées dans l'apoptose.

Différentes conditions ont été testées :

- Les cellules EAh926 ont étéensemencées à différentes densités : 50 000, 40 000, ou 35 000 cellules par puits.
- Deux concentrations en étoposide ont été testées : 150 μ M et 200 μ M.
- Différents temps de perméabilisation ont été expérimentés : 5, 4, et 3 minutes.
- Plusieurs marqueurs de l'apoptose ont été utilisés : un anticorps anti-caspase-3 active, un anticorps anti-caspase-9 clivée, et un anticorps anti-PARP fragment p85.

Les conditions qui ont permis d'obtenir des images interprétables sont les suivantes. Les cellules EAh926 ont étéensemencées à une densité de 35 000 cellules par puits d'une boîte 24 puits et l'apoptose a été induite par l'ajout d'étoposide à une concentration de 150 μ M. Les cellules ont été incubées soit 7 heures en normoxie, en hypoxie chronique, ou en hypoxie intermittente, soit 16 heures en normoxie ou en hypoxie chronique. A la fin des incubations, les cellules ont été fixées et perméabilisées pendant 3 minutes. Celles qui sont entrées en apoptose ont été détectées à l'aide d'un anticorps reconnaissant spécifiquement la caspase-3 active. Les expériences réalisées avec les deux autres anticorps ne montrent pas de marquage spécifique. L'anticorps spécifique de la caspase-3 active a ensuite été visualisé au moyen d'un anticorps anti-immunoglobuline de lapin couplé à l'Alexa 488 qui émet de la fluorescence après excitation à une longueur d'onde déterminée. Après une nuit à 4°C, les

lames ont été observées au microscope confocal, de manière semi-quantitative, en gardant le photomultiplicateur constant.

Les noyaux sont marqués au TOPRO-3 et la fluorescence est observée au microscope confocal après excitation aux longueurs d'onde spécifiques.

Analyse des résultats

Ces expériences d'immunofluorescence mettent en évidence d'une part, une augmentation du nombre de cellules marquées en présence d'étoposide et d'autre part, une diminution de l'abondance de la forme active de la caspase-3 dans les cellules EAhy926 après 16 heures d'hypoxie chronique en présence d'étoposide, comparativement aux cellules maintenues 16 heures en normoxie et en présence d'étoposide (Figure 6). Cette diminution s'observe également après une incubation de 7 heures en hypoxie chronique ou intermittente + étoposide, comparativement aux cellules incubées 7 heures en normoxie et en présence d'étoposide (Figure 7). Cependant, la diminution observée est moins importante en condition d'hypoxie intermittente. Il faut néanmoins noter que le nombre de cellules en apoptose est relativement faible et n'augmente pas entre 7 et 16 heures d'incubation. De plus, le marquage est fort ponctué, marquant peut-être des corps apoptotiques en train de se détacher.

Ces expériences d'immunofluorescence tendent à montrer un effet protecteur de l'hypoxie contre l'apoptose des cellules endothéliales ; l'hypoxie intermittente serait une moins bonne protectrice que l'hypoxie chronique.

Conclusions

La première partie de ce mémoire avait pour but d'étudier l'effet de l'hypoxie chronique ou intermittente sur l'apoptose induite par l'étoposide des cellules EAhy926. Différentes expériences ont été réalisées en suivant différentes étapes du processus apoptotique. Les résultats de ces expériences sont résumés dans le Tableau 1.

En fait il est difficile d'en tirer une conclusion claire car selon le paramètre suivi, on observe ou pas une protection de l'apoptose en condition d'hypoxie par rapport à la normoxie. Quand il y a protection, l'hypoxie chronique semble apporter en général une meilleure protection que l'hypoxie intermittente. Comment pourrait-on interpréter cette variabilité dans les résultats ?

La première chose à mentionner est que les cellules endothéliales sont en général très résistantes à l'apoptose. Si on regarde les images obtenues en microscopie confocale, on n'observe que peu de cellules en apoptose, ce qui est en accord avec la grande résistance des cellules endothéliales à l'apoptose. Une proportion faible de cellules par rapport à la population est donc « mesurée » quand on réalise des dosages sur l'entièreté de la population comme ce fut le cas lors des expériences décrites aux figures 1 à 5. Ceci est peut-être une première source de variabilité.

Le deuxième point à mentionner est que le nombre des cellules en apoptose observé sur les images obtenues en microscopie confocale n'augmente pas entre 7 et 16 heures d'incubation en présence d'étoposide. De plus, les cellules marquées semblent en fait être plus des corps apoptotiques, c'est-à-dire en phase terminale d'apoptose. Ces corps se détachent

ensuite pour se retrouver dans le milieu de culture. Nous pourrions donc émettre l'hypothèse qu'au cours de l'incubation, il y a tout le temps une petite proportion de cellules qui initient et terminent le processus apoptotique, et ce de manière non synchronisée, de sorte que cette proportion n'augmente pas avec le temps. Un effet protecteur sur ce genre de cinétique est donc très difficile à mettre en évidence, surtout si ce n'est pas une inhibition complète qu'engendre l'hypoxie mais plutôt un retard dans l'initiation de l'apoptose.

Une synchronisation du cycle cellulaire ou la mise au point d'un modèle d'apoptose induisant la mort d'une plus grande proportion de cellules devrait être envisagée dans la suite du travail afin de mieux caractériser l'effet de l'hypoxie sur l'apoptose.

II. Etude de l'expression des gènes impliqués dans l'apoptose

La deuxième partie du travail a été dédiée à l'étude de l'expression d'une série de gènes dont les produits sont impliqués dans la régulation de l'apoptose. Pour ce faire, nous avons utilisé le micro-damier « DualChip human apoptosis ». Ce damier couvre 123 gènes marqueurs humains importants (en triplicats) qui permettent d'évaluer les réponses cellulaires à des stress induisant l'apoptose (liste de ces gènes en annexe 1). Une validation a ensuite été réalisée pour certains gènes, par real-time PCR pour l'ARNm et par western blot pour la protéine correspondante. Le but de cette étude était de voir si on pourrait corrélérer des variations de l'expression de certains gènes au degré d'induction d'apoptose observé dans les différentes conditions étudiées.

1. Etude de l'expression des gènes impliqués dans l'apoptose au moyen de l'apoptochip

En pratique, les cellules EAhy926 ont été repiquées dans des boîtes de culture T75. Deux jours plus tard, elles ont été incubées 7 heures en normoxie, en hypoxie chronique ou en hypoxie intermittente, ainsi que 16 heures en normoxie ou en hypoxie chronique, le tout avec et sans étoposide à 150 μ M. Après l'incubation, l'ARN total de chacune des boîtes de culture a été extrait. Après quantification, son intégrité a été vérifiée à l'aide du bioanalyseur Agilent. 2 μ g d'ARN total ont ensuite été rétrotranscrits en ADNc tout en incorporant des dCTP biotinylés. Le produit de cette rétrotranscription a finalement été hybridé sur la « DualChip human apoptosis ». Après lavages et séchages, les lames ont été scannées et l'intensité des spots quantifiée. Un traitement des données qui tient compte des contrôles positifs et négatifs d'hybridation, de rétrotranscription et de l'expression des « house keeping genes » a finalement permis d'obtenir des rapports d'expression par rapport à la condition contrôle correspondante.

Analyse des résultats

Comme le fait un gel d'agarose dénaturant, le bioanalyseur Agilent fractionne les molécules d'ARN selon leur taille, ce qui rend possible la détermination des quantités d'ARN ribosomal (ARNr) 18S et 28S. Le ratio de la bande de l'ARN 28S sur celle du 18S approchera 2 : 1 dans les échantillons d'ARN composés essentiellement d'ARN entier. La figure 8 représente deux des graphes obtenus après l'analyse de l'intégrité de l'ARN total. Nous observons bien que l'ARN est de très bonne qualité. En effet, le pic de l'ARNr 18S débute au niveau de la ligne de base, ce qui signifie qu'il n'est pas dégradé, tandis que le pic de l'ARNr 28S démarre un tout petit peu plus haut que le niveau de la ligne de base (voir flèche sur la figure 8), il est donc peut-être très légèrement dégradé. Les ratios obtenus pour ces deux

graphes sont respectivement de 2,2 : 1 et de 1,8 : 1 ; l'intégrité des échantillons d'ARN est donc respectée.

Parmi les 123 gènes détectables sur la « DualChip human apoptosis », 47 voient leur expression changer après 7 heures dans au moins une des conditions étudiées. Ces changements d'expression sont repris dans le Tableau 2. Nous allons successivement analyser ceux qui sont induits par l'hypoxie, par l'étoposide seul et finalement par l'hypoxie en présence d'étoposide.

L'hypoxie est connue pour diminuer de façon générale la transcription et la traduction (Erler et al., 2004 ; Michiels, 2004). Cependant, certains gènes, impliqués la plupart du temps dans la survie cellulaire, sont spécifiquement surexprimés dans certaines conditions (voir point I.2. de l'introduction). Les résultats présentés au Tableau 2 montrent effectivement que l'hypoxie chronique induit une diminution de l'expression de nombreux gènes. Parmi ceux détectables sur le micro-damier, seul BNIP3 voit son expression augmenter (de 217%). Bruick (2000) avait déjà montré que BNIP3 est un gène inductible par l'hypoxie, validant ainsi nos résultats. L'hypoxie intermittente, si elle engendre aussi une diminution générale de l'expression des gènes, ne semble pas induire celle de BNIP3. Par contre, trois gènes voient leur expression augmenter dans ces conditions, il s'agit des gènes encodant la caspase-8, la cycline D1 et la CDC-like kinase 1 (CLK1). L'hypoxie intermittente a donc un effet différent de celui de l'hypoxie chronique.

L'étoposide est connu pour induire des dommages à l'ADN, ce qui provoque la phosphorylation de la protéine p53 et l'apoptose des cellules en augmentant l'expression des protéines pro-apoptotiques. Les résultats présentés au Tableau 2 montrent effectivement que l'étoposide induit une augmentation de l'expression de nombreux gènes. Parmi ceux détectables sur le micro-damier, six gènes voient leur expression augmenter fortement, il s'agit de la protéine A1 apparentée à Bcl2 (BCL2A1, 466%), de BIRC3 (250%), de CDKN1A (366%), de CLK1 (136%), de la protéine GADD45A (915%) et de l'antigène nucléaire des cellules proliférantes (PCNA, 110%). Kannan et al. (2000) avaient montré que CDKN1A, GADD45A et PCNA étaient induits par p53, validant ainsi nos résultats. Cependant, ils avaient trouvé que CLK1 était supprimé par p53. Sun (2000) avait également montré que CDKN1A, PCNA et GPX1 étaient surexprimés en présence d'étoposide. Wang et al. (1999) ont quant à eux montré que BCL2A1 était un gène anti-apoptotique inhibant l'apoptose induite par l'étoposide.

L'analyse va maintenant porter sur les effets de l'hypoxie (chronique et intermittente) en présence d'étoposide sur l'expression des gènes présents sur le micro-damier. Les gènes surexprimés sont pour la plupart les mêmes que ceux dont l'expression augmente en présence d'étoposide (Tableau 2). En hypoxie chronique, nous pouvons observer des effets combinés de l'étoposide et de l'hypoxie sur l'expression de ces gènes. Par exemple, pour BCL2A1, BIRC3 et JUN, le niveau d'expression est plus élevé en hypoxie + étoposide qu'en présence d'étoposide seul probablement parce que l'hypoxie et l'étoposide surexpriment tous les deux ce gène. Cet effet de synergie est observé en hypoxie chronique et en hypoxie intermittente. Cependant, pour GPX1 et PCNA, le niveau d'expression est plus faible en hypoxie + étoposide qu'en présence d'étoposide seul probablement parce que l'étoposide surexprime ce gène mais que l'hypoxie le sous-exprime. Par contre, l'hypoxie n'affecte pas l'augmentation d'expression induite par l'étoposide de CLK1 et de GADD45A.

Sur les dix-huit gènes dont l'expression varie sur la « DualChip human apoptosis » après une incubation de 16 heures (Tableau 3), plus de la moitié sont surexprimés en condition d'hypoxie. Cette surexpression est très élevée pour les gènes IGFBP5 et IGFBP6. En présence d'étoposide, l'expression de la plupart des dix-huit gènes augmente, et ce de façon plus importante qu'à 7 heures pour les gènes BNIP3, CDKN1A, GADD45A, GPX1, IGFBP5 et MDM2. Par contre, en hypoxie + étoposide, l'expression des gènes détectés sur le micro-damier est toujours diminuée par rapport à la condition d'incubation en hypoxie seule ou en présence d'étoposide seul, ce qui n'était pas observé après une incubation de 7 heures (Tableau 2).

Quatre gènes dont l'expression varie de manière importante selon les différentes conditions expérimentales ont été retenus pour les expériences suivantes ; il s'agit de CDKN1A, GADD45A, GPX1, et JUN.

L'expression de CDKN1A diminue en hypoxie chronique en présence d'étoposide, que ce soit après une incubation de 7 heures ou de 16 heures, comparativement à la condition de normoxie + étoposide. Par contre, elle augmente en condition d'hypoxie intermittente en présence d'étoposide.

L'expression de GADD45A varie de la même manière que celle du gène CDKN1A selon les différentes conditions d'incubations. Celle de GPX1 varie également de la même manière que CDKN1A excepté qu'en hypoxie intermittente + étoposide, son expression diminue encore plus qu'en hypoxie chronique + étoposide.

Comparativement à la condition d'incubation de 7 heures en normoxie + étoposide, l'expression de JUN augmente en hypoxie chronique + étoposide et augmente encore plus en hypoxie intermittente + étoposide. Par contre, après une incubation de 16 heures en présence d'étoposide, l'expression de JUN diminue en hypoxie chronique par rapport à la normoxie.

2. Etude de l'expression de quatre gènes impliqués dans l'apoptose par real-time RT PCR

Afin de confirmer les résultats obtenus à l'aide de l'apoptochip, une PCR en temps réel après rétrotranscription a été réalisée afin de quantifier l'ARNm des quatre gènes d'intérêt cités ci-dessus.

Pour cela, les cellules EAhy926 ont été placées en normoxie, en hypoxie chronique ou en hypoxie intermittente, pendant 7 ou 16 heures, en présence ou non d'étoposide à 150 μ M. L'ARN total a été extrait des cellules, et une rétrotranscription de l'ARNm en ADNc a été réalisée en utilisant une amorce polyT. Enfin, la PCR en temps réel a été effectuée. Les résultats normalisés par rapport à l' α -tubuline (gène de maintenance) sont représentés aux Tableaux 4 et 5.

Analyse des résultats

Les résultats obtenus pour une incubation de 7 heures sont représentés au Tableau 4, tandis que ceux obtenus pour une incubation de 16 heures sont représentés au Tableau 5.

Les variations du niveau d'expression des gènes en real-time PCR suivent en partie les variations observées avec l'apoptochip :

CDKN1A est sous-exprimé après une incubation de 7 ou 16 heures des cellules en hypoxie (chronique ou intermittente). L'étoposide seul a comme effet de surexprimer CDKN1A aussi bien après 7 heures qu'après 16 heures d'incubation. En présence d'étoposide, l'hypoxie chronique (7 et 16 heures) a comme effet de surexprimer CDKN1A mais de manière moins importante que ne le fait l'étoposide seul. Par contre, en présence d'étoposide, l'hypoxie intermittente a peu d'effet. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus avec le micro-damier.

Après une incubation de 7 ou 16 heures des cellules en hypoxie chronique ou intermittente, GADD45A est surexprimé. L'étoposide seul a comme effet de surexprimer GADD45A après 7 heures d'incubation et de manière très importante après 16 heures d'incubation. En présence d'étoposide, l'hypoxie chronique (7 et 16 heures) et l'hypoxie intermittente (7 heures) ont comme effet de surexprimer GADD45A de manière plus prononcée que ne le fait l'étoposide seul.

Par rapport à la normoxie, le niveau d'expression de GPX1 en hypoxie chronique et intermittente ne varie pas beaucoup, aussi bien après 7 heures qu'après 16 heures d'incubation. L'étoposide seul a comme effet de surexprimer GPX1 après 7 heures d'incubation et encore plus après 16 heures d'incubation. L'effet conjugué de l'étoposide et de l'hypoxie chronique (7 heures) est de surexprimer encore un peu plus le niveau de GPX1, tandis que ce niveau diminue en hypoxie intermittente + étoposide par rapport à l'hypoxie chronique + étoposide. Par contre, après 16 heures d'incubation, l'effet conjugué de l'étoposide et de l'hypoxie chronique est de surexprimer le niveau de GPX1 mais un peu moins qu'en présence d'étoposide seul. Ces tendances avaient déjà été observées sur les résultats obtenus avec le micro-damier.

JUN est surexprimé après une incubation de 7 ou 16 heures en hypoxie chronique, mais son niveau d'expression ne varie pas en hypoxie intermittente. L'étoposide seul a comme effet de surexprimer JUN et ce d'autant plus que le temps d'incubation est long. L'effet conjugué de l'étoposide et de l'hypoxie chronique (7 heures et 16 heures) est d'augmenter encore plus le niveau de JUN. L'hypoxie intermittente augmente encore plus cette expression. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus à l'aide de l'apoptochip si ce n'est pour l'effet de l'hypoxie chronique à 7 heures mais de nouveau avec une amplitude de surexpression plus grande.

Si de manière générale, les surexpressions étaient détectées par le micro-damier, l'amplitude de la surexpression mesurée par real-time PCR est beaucoup plus grande. Cette différence pourrait peut-être être expliquée soit par le fait que la PCR en temps réel a un « dynamic range » plus grand que celui du micro-damier, soit parce que les « house keeping genes » considérés dans les deux cas ne sont pas les mêmes. Il faut également noter que ces expériences n'ont pu, dans le temps imparti, être réalisées que sur une seule série d'échantillons aussi bien pour le micro-damier que pour la RT real-time PCR. Il faudrait pouvoir répéter ces expériences afin d'en confirmer les résultats.

3. Etude du niveau d'expression des protéines c-jun et p21 par western blot

Une induction du niveau d'ARNm d'un gène n'est pas toujours suivie d'une augmentation de l'expression de la protéine correspondante. Afin de voir si l'augmentation de l'expression des gènes observée ci-dessus au niveau de l'ARNm se traduit également au

niveau protéique, des analyses en western blot ont été réalisées pour les protéines contre lesquelles un anticorps était disponible au laboratoire.

Pour cela, les cellules EAhy926 ont étéensemencées dans des boîtes de culture T25. Elles ont ensuite été placées en normoxie, en hypoxie chronique ou en hypoxie intermittente, pendant 7 ou 16 heures, en présence ou non d'étoposide à 150 μ M. Une fois les incubations terminées, les cellules ont été lysées et les protéines ont été séparées du lysat cellulaire par électrophorèse. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de PVDF. Les protéines c-jun et p21 ont alors été détectées à l'aide d'un anticorps primaire spécifiquement dirigé contre un de leurs épitopes, puis par un anticorps secondaire reconnaissant le fragment Fc des anticorps, couplé à un système de révélation.

Analyse des résultats

La figure 9 représente graphiquement les résultats obtenus pour la détection de c-jun en western blot. Nous observons qu'une incubation de 7 heures en hypoxie chronique augmente le niveau protéique de c-jun, ce n'est cependant pas le cas pour 16 heures d'incubation. L'hypoxie intermittente seule n'a pas d'effet. Par ailleurs, après une incubation de 7 heures ainsi qu'après une incubation de 16 heures en présence d'étoposide, le niveau protéique de c-jun augmente nettement. L'hypoxie chronique (7 heures et 16 heures) n'influence pas cette augmentation alors que l'hypoxie intermittente semble la diminuer.

Pour comparer ces résultats obtenus en suivant l'ARNm, un graphe représentant les niveaux d'induction de la protéine c-jun par rapport à la normoxie a été réalisé (figure 10). L'augmentation de l'expression de c-jun après 7 heures d'incubation en hypoxie chronique, mais pas en intermittente, observée au niveau protéique correspond bien aux variations de la quantité d'ARNm observées par PCR en temps réel. Il en est de même pour l'effet de l'étoposide même si l'augmentation au niveau protéique est de moindre amplitude que celle observée au niveau de l'ARNm.

On a donc une bonne cohérence pour c-jun, entre l'augmentation du niveau de l'ARNm et de la quantité de protéine.

La figure 11 représente graphiquement les résultats obtenus pour la détection de p21, produit du gène CDKN1A, en western blot. L'hypoxie chronique (7 et 16 heures) ou intermittente diminue l'expression de p21. Par ailleurs, l'étoposide l'augmente fortement. Après une incubation de 7 ou 16 heures en présence d'étoposide, le niveau protéique de p21 en condition d'hypoxie chronique ou intermittente est nettement plus bas qu'en condition de normoxie. L'hypoxie atténue donc fortement l'effet de l'étoposide.

Pour comparer ces résultats à ceux obtenus à l'aide de l'apoptochip, un graphe représentant les niveaux d'induction de la protéine p21 par rapport à la normoxie a été réalisé (figure 12). La diminution de l'ARNm de CDKN1A induite par toutes les conditions d'hypoxie étudiées et observée à la fois à l'aide du micro-damier et de la PCR en temps réel se retrouve bien au niveau protéique. De même, il y a un net parallélisme entre l'induction de l'ARNm et de la protéine en présence d'étoposide. Par contre, l'effet inhibiteur de l'hypoxie sur l'induction engendrée par l'étoposide est plus marqué au niveau protéique qu'au niveau ARNm.

Pour les deux protéines analysées ici, on retrouve en général un parallélisme entre les variations d'expression de l'ARNm et de la protéine correspondante. Il faut cependant noter que ce n'est pas toujours le cas car il existe des régulations aux niveaux traductionnels et post-traductionnels. Des expériences supplémentaires devront donc être réalisées afin de suivre le niveau d'expression des autres protéines d'intérêt.

On peut cependant déjà remarquer avec les deux exemples étudiés ici, que l'hypoxie et l'étoposide n'ont pas toujours le même effet en fonction des gènes ou des protéines étudiés puisqu'ici la surexpression de c-jun induite par l'étoposide n'est pas ou peu influencée par l'hypoxie alors que celle de p21 est nettement inhibée.

III. Rôle des facteurs de transcription p53 et AP-1

Les études réalisées jusqu'à présent montrent d'une part, que l'hypoxie pourrait influencer l'apoptose induite par l'étoposide et d'autre part, qu'elle influence également les variations d'expression des gènes induites par l'étoposide. Les changements d'expression génique sont régulés par l'activation de facteurs de transcription. Nous avons donc étudié, dans la suite du travail, l'effet de l'étoposide et de l'hypoxie, seuls ou combinés, sur l'activité de deux de ces facteurs : d'une part, p53 car c'est le principal facteur activé par les dommages à l'ADN et conduisant à l'apoptose et d'autre part, AP-1. AP-1 est un facteur dimérique dont c-jun est l'une des sous-unités principales ; c-fos en est une autre. Comme nous avons détecté des variations de l'expression de c-jun aussi bien au niveau ARNm qu'au niveau protéique dans les différentes conditions expérimentales étudiées, il nous semblait intéressant de suivre son activité.

1. Activité de liaison à l'ADN de p53 et AP-1

Afin de suivre l'activation de ces deux facteurs de transcription, nous avons utilisé un test trans-AM qui mesure leur capacité de liaison à l'ADN.

Les cellules EAhy926 ont été placées en normoxie, en hypoxie chronique ou en hypoxie intermittente, pendant 7 ou 16 heures, en présence ou non d'étoposide à 150 μ M, et des extraits nucléaires ont ensuite été préparés. Ceux-ci ont alors été incubés en présence du tampon de liaison adéquat dans les puits tapissés de trappeurs d'ADN double brin contenant la séquence consensus reconnue par p53 ou AP-1. Après plusieurs lavages, la liaison des facteurs de transcription à leur séquence cible fixée au fond des puits a été mise en évidence par une incubation avec un anticorps primaire dirigé contre p53, c-jun, ou c-fos, suivie d'une incubation en présence de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase. La révélation a été réalisée en présence du substrat de l'enzyme et l'absorbance du produit de cette réaction colorimétrique a été mesurée. Le test colorimétrique a également été effectué sur un puits ne contenant pas d'extrait de protéines nucléaires. La valeur de ce blanc retirée, les résultats sont présentés sous forme de graphique (figures 13, 14, et 15).

Analyse des résultats

Nous observons que le niveau de liaison de p53 à sa séquence consensus augmente nettement en présence d'étoposide (figure 13), ce qui est attendu puisque cette molécule provoque des dommages à l'ADN qui aboutissent à l'activation de ce facteur de transcription.

L'hypoxie seule quant à elle ne semble pas avoir d'effet sur l'activation de la liaison à l'ADN de p53 aux temps courts mais diminue cette activité après 16 heures d'incubation.

Après une incubation de 16 heures en hypoxie chronique et en présence d'étoposide, la liaison de p53 à sa séquence cible diminue légèrement par rapport à la condition normoxie + étoposide (figure 13). Une légère diminution est également observée après une incubation de 7 heures en hypoxie intermittente et en présence d'étoposide. Par contre, le niveau de liaison de p53 ne varie pas lorsqu'on compare les conditions d'incubation de 7 heures en normoxie + étoposide et en hypoxie chronique + étoposide (figure 13).

En ce qui concerne AP-1, des résultats similaires sont observés pour c-jun (figure 15) et c-fos (figure 14) : l'étoposide augmente la liaison à l'ADN de AP-1 alors que l'hypoxie seule n'a pas d'effet. De plus, l'hypoxie, quelles que soient les conditions, n'influence pas l'effet de l'étoposide. Il est à noter que ces résultats sont tout à fait parallèles aux variations de la quantité de la protéine c-jun dans les différentes conditions.

L'ensemble de ces résultats montre que l'étoposide active au moins deux facteurs de transcription : p53 et AP-1. L'activation de p53 par cet inhibiteur de la topoisomérase a déjà été décrite dans d'autres études (Brantley-Finley et al., 2003 ; Clifford et al., 2003). Elle est probablement responsable de l'augmentation de l'expression de gènes cibles de p53 observée dans les résultats précédents (point II), comme CDKN1A, GADD45A, BAX ou GPX1.

Par ailleurs, nous observons une activation de AP-1 parallèle à une augmentation de la quantité de la protéine c-jun. L'influence de ce facteur sur les variations d'expression génique induites par l'étoposide reste à être étudiée.

L'hypoxie seule ne semble pas influencer l'activité de liaison à l'ADN de AP-1 (figures 14 et 15). Par contre, à long terme (16 heures), elle diminue celle de p53 (figure 13). Cette observation a déjà été réalisée au laboratoire pour un autre type cellulaire (les cellules HepG2). Cet effet de l'hypoxie pourrait être responsable de la diminution de l'augmentation de l'expression induite par l'étoposide des gènes comme BAG1, BAX, CDKN1A et GPX1 (Tableaux 2 et 3).

Nous observons donc une corrélation entre les variations de l'activité de p53 et les variations de l'expression de ses gènes cibles entre les différentes conditions expérimentales.

2. Rôle du facteur AP-1 dans la protection contre l'apoptose induite par l'étoposide

Les facteurs de transcription p53 et AP-1 sont connus pour être pro-apoptotiques bien que AP-1 ait aussi été décrit comme anti-apoptotique (Bossy-Wetzel et al., 1997 ; Stempien-Otero et al., 1999 ; Maxwell et al., 1999 ; Ham et al., 2000 ; Fan et al., 2001 ; Pulukuri et Rao, 2005). La corrélation entre l'activité de p53 et l'expression de ses gènes cibles en normoxie et en hypoxie en présence d'étoposide pourrait expliquer une induction moindre de l'apoptose par l'étoposide en hypoxie par rapport à la normoxie. Par contre, le rôle d'AP-1 est moins clair car sa contribution aux variations d'expression des gènes étudiés n'est pas définie. Afin de mieux cerner ce rôle, une autre approche expérimentale a été utilisée. Nous avons utilisé un inhibiteur de la kinase activatrice en amont de ce facteur pour inhiber son activité et suivre l'influence de cette inhibition sur l'induction de l'apoptose. Deux caractéristiques de l'apoptose ont été suivies dans le cadre de ce travail, l'activation des caspases et le clivage de la protéine PARP.

2.1. Activité des caspases

L'effet de l'inhibiteur de la JUN Kinase, le SP600125, a donc été testé sur l'activité des caspases-3 et -7 suivie par un test luminescent en présence et en absence d'étoposide, en normoxie ou en hypoxie.

Pour cela, les cellules EAhy926 ont étéensemencées à une densité de 50 000 cellules par puits d'une plaque 24 puits. Elles ont ensuite été placées en normoxie, en hypoxie chronique ou en hypoxie intermittente, pendant 7 ou 16 heures, en présence ou non d'étoposide à 150 μ M, et en présence ou non de SP600125 à 20 μ M. Une fois les incubations terminées, les cellules ont été lysées, ce qui permet aux caspases actives de cliver un substrat proluminescent (Z-DEVD-aminoluciférine) ajouté dans chaque puits. Le substrat de la luciférase (l'aminoluciférine) est alors libéré, permet la réaction de la luciférase et provoque donc la production de lumière. Celle-ci a été mesurée à l'aide d'un luminomètre. Ce test luminescent a également été effectué sur un puits ne contenant pas de cellules. La valeur de ce blanc retirée, les résultats sont présentés sous forme de graphique (figure 16).

Analyse des résultats

La figure 16 représente graphiquement les résultats obtenus. Comme nous l'avions précédemment observé, quelles que soient les conditions d'incubation testées, l'étoposide augmente l'activité des caspases-3 et -7. Nous observons également que l'ajout de l'inhibiteur de la JUN Kinase augmente encore plus cette activité. De plus, si nous comparons les conditions d'incubation de 7 heures en normoxie + étoposide + SP600125, et en hypoxie chronique ou intermittente + étoposide + SP600125, nous observons une diminution de l'activité des caspases-3 et -7 en hypoxie.

L'ensemble de ces résultats montre que l'ajout de l'inhibiteur de AP-1 aggrave l'apoptose en présence d'étoposide, que ce soit en normoxie ou en hypoxie.

2.2. Etude du clivage de PARP

Pour confirmer ces résultats, le clivage de la protéine PARP en présence ou en absence de l'inhibiteur de la JUN Kinase a été suivi.

Pour cela, les cellules EAhy926 ont étéensemencées dans des boîtes de culture T25. Elles ont ensuite été placées en normoxie, en hypoxie chronique ou en hypoxie intermittente, pendant 7 ou 16 heures, en présence ou non d'étoposide à 150 μ M, et en présence ou non de SP600125 à 20 μ M. Une fois les incubations terminées, les cellules ont été lysées et les protéines ont tout d'abord été séparées du lysat cellulaire en fonction de leur poids moléculaire grâce à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de PVDF. La protéine PARP a alors été détectée à l'aide d'un anticorps reconnaissant spécifiquement le fragment clivé de PARP, puis par un anticorps secondaire reconnaissant le fragment Fc des anticorps, couplé à un système de révélation.

Analyse des résultats

Les résultats obtenus pour la détection de PARP en western blot sont illustrés à la figure 17. L'intensité des bandes correspondantes a été mesurée et est présentée graphiquement sur la même figure. Nous observons toujours que l'étoposide augmente la

quantité de la forme clivée de PARP quelles que soient les conditions d'incubation testées. Nous observons également que l'ajout de SP600125 augmente encore plus la quantité de la protéine PARP et ce dans toutes les conditions étudiées. Ces résultats confirment ceux obtenus dans l'expérience précédente. Nous pouvons donc suggérer que l'inhibition de AP-1 augmente l'apoptose des cellules endothéliales EAhy926.

Conclusion et Perspectives

Conclusion et perspectives

La majorité des cellules ont besoin d'oxygène pour survivre. Cet oxygène est un substrat essentiel car il sert d'accepteur final des électrons dans la respiration cellulaire et permet donc aux cellules de synthétiser de l'ATP via la phosphorylation oxydative. Dans le but d'assurer un apport systémique en oxygène, des systèmes respiratoire, vasculaire et circulatoire assurent donc la capture et la distribution de l'oxygène vers l'ensemble des cellules de l'organisme.

Cependant, il arrive, dans des conditions normales ou pathologiques, que l'environnement de la cellule devienne hypoxique. La dépendance cellulaire de la respiration aérobie en tant que source d'énergie obligatoire requiert alors une multitude de réponses à ce manque d'oxygène. En réponse à cette hypoxie, les cellules eucaryotes vont donc s'adapter afin de s'assurer un apport en ATP suffisant pour survivre. D'une manière générale, ces adaptations se traduisent par une réorganisation du métabolisme énergétique entraînant une production d'ATP indépendante de l'oxygène (via l'activation de la glycolyse). Les conditions d'hypoxie inhibent la transcription de manière générale mais elles induisent cependant la transcription de certains gènes participant à la réponse adaptative des cellules à l'hypoxie. Cette induction passe par l'activation du facteur de transcription HIF-1. Un des gènes cibles de HIF-1 est celui codant pour le VEGF, un facteur de croissance qui entraîne la migration et la prolifération des cellules endothéliales, ce qui permet la mise en place d'un nouveau réseau de vaisseaux sanguins. Cette néovascularisation permet alors d'apporter l'oxygène à la zone hypoxique.

Les cellules tumorales sont elles aussi dépendantes de l'oxygène, ce qui constitue un facteur limitant pour leur croissance. En effet, lorsque les cellules cancéreuses prolifèrent, la tumeur grossit et son centre se retrouve au-delà de la limite de diffusion de l'oxygène à partir des capillaires adjacents ; une zone hypoxique s'installe alors. Une réponse adaptative se met dès lors en place dans laquelle HIF-1 est activé, induisant, via la sécrétion de VEGF, un processus de néoangiogenèse destiné à irriguer la tumeur. Limiter cette réponse angiogénique constitue maintenant un nouvel outil pour la thérapie anti-cancéreuse. Il s'agit en fait de cibler les cellules endothéliales des nouveaux vaisseaux tumoraux afin d'en induire la mort, souvent par apoptose. Cependant, bien que les résultats d'expériences utilisant différentes molécules « anti-angiogéniques » aient été encourageants chez les souris, ceux obtenus en essais cliniques chez l'homme l'étaient beaucoup moins. Il faut donc maintenant mieux comprendre la résistance des cellules endothéliales des tumeurs à ces molécules « anti-angiogéniques » afin d'en affiner leur efficacité. Une des hypothèses de travail serait que l'architecture aberrante des néovaisseaux tumoraux n'engendre pas une perfusion normale de la tumeur. Les cellules endothéliales de ces vaisseaux se retrouvent alors dans des conditions d'hypoxie ou d'hypoxie intermittente. Ces conditions pourraient influencer l'effet apoptotique des molécules anti-angiogéniques. Le but de notre travail se situe dans ce cadre. Nous avons donc étudié l'influence des conditions d'hypoxie et d'hypoxie intermittente d'une part, sur l'expression d'une série de gènes dont les produits sont impliqués dans le processus apoptotique et d'autre part, sur la mort des cellules endothéliales induite par une molécule utilisée en thérapie anti-cancéreuse, l'étoposide.

Pour étudier l'effet de l'hypoxie sur l'apoptose des cellules endothéliales, une étude des variations de l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose a été réalisée dans différentes conditions expérimentales. Cette étude a permis de montrer qu'en général, l'hypoxie diminuait l'expression des gènes présents sur le micro-damier, que l'étoposide en augmentait l'expression et que la combinaison de l'hypoxie et de l'étoposide diminuait à long terme l'expression de ces gènes surexprimés en présence d'étoposide. Cependant, ce n'est pas le cas pour tous les gènes, suggérant donc que les effets de l'hypoxie et de l'étoposide dépendent du gène étudié.

Comparativement à ces observations, nous avons investigué les effets des conditions d'incubation en hypoxie avec ou sans étoposide sur l'activation de deux facteurs de transcription, p53 et AP-1. Cette étude a également montré que l'hypoxie diminuait l'activité de p53 et n'influencait pas celle de AP-1, que l'étoposide activait ces deux facteurs de transcription et que la combinaison de l'hypoxie et de l'étoposide diminuait l'expression de p53 mais n'influencait pas celle de AP-1.

Ces deux approches différentes mettent en évidence des corrélations entre l'activation de ces deux facteurs de transcription et la régulation ou l'expression des gènes impliqués dans l'apoptose dans les conditions d'hypoxie et/ou en présence d'étoposide. Le profil d'expression de différents gènes connus pour être des gènes cibles de p53 suit effectivement le profil d'activité de p53. Parmi les gènes pour lesquels un tel profil est retrouvé, citons CDKN1A, BAX, PCNA, MDM2 et GPX1. Par ailleurs, le profil d'expression de BCL2A1, BIRC3, CLK1, en tout cas après 7 heures d'incubation, ressemble au profil d'activité de AP-1. Des expériences futures en présence d'incubation de la JNK devraient déterminer si la surexpression de ces trois gènes dépend effectivement de AP-1.

Il faut également noter que le facteur de transcription HIF-1 joue probablement également un rôle dans l'augmentation de l'expression de certains gènes en hypoxie, comme BNIP3 ou MCL1. Au laboratoire, Sébastien Toffoli a en effet montré que ce facteur était effectivement activé dans les cellules EAhy926 aussi bien en hypoxie chronique qu'en hypoxie intermittente.

En parallèle à ces résultats, une autre approche expérimentale nous a permis de constater une protection des cellules endothéliales contre l'apoptose induite par l'étoposide en condition d'incubation en hypoxie. Cependant, en fonction du paramètre étudié, une protection n'est pas systématiquement observée. Les raisons expliquant la pauvre reproductibilité des résultats ont été présentées dans la conclusion de la première partie du chapitre « Résultats et Discussion ». Comme les effets observés au niveau cellulaire sont la conséquence de variations dans l'expression de certains gènes, il nous a semblé intéressant de corrélér, avec ces résultats et préliminaires, dans les conditions d'hypoxie en présence d'étoposide, une augmentation dans l'expression des gènes anti-apoptotiques et/ou une diminution dans l'expression des gènes pro-apoptotiques avec le degré de survie cellulaire observé dans chacune de ces conditions.

Le niveau d'expression de certains gènes anti-apoptotiques (tels que BIRC3 et MCL1) augmente effectivement en condition d'hypoxie + étoposide et celui de certains gènes pro-apoptotiques (tels que BAX, BID et LTA) diminue dans les mêmes conditions (Tableaux 2 et 3 de la partie Résultats), ce qui pourrait expliquer l'effet protecteur potentiel de l'hypoxie. Piret et al. (2005) ont également montré que le niveau d'expression de MCL1 augmente en condition d'hypoxie, alors que Erler et al. (2004) ont montré que le niveau d'expression de

BAX et BID diminue en condition d'hypoxie + étoposide, confirmant ainsi nos résultats. Malgré cela la tendance opposée s'observe également. En effet, des gènes anti-apoptotiques tels que BIRC5 sont sous-exprimés en hypoxie + étoposide, tandis que des gènes pro-apoptotiques tels que BNIP3 et BAG1 sont surexprimés dans ces conditions (Tableaux 2 et 3 de la partie Résultats). Bruick (2000) a également montré que BNIP3 est un gène inducible par l'hypoxie. C'est donc probablement l'intégration de tous les signaux engendrés par ces variations d'expression qui fera que la balance penche soit du côté anti-apoptotique, soit du côté pro-apoptotique.

Toutefois, nous avons constaté que lorsqu'il y avait protection, l'hypoxie chronique semblait apporter en général une meilleure protection contre l'apoptose que l'hypoxie intermittente. Pour corrélérer cette observation avec les variations d'expression des gènes du micro-damier, il faudrait observer une surexpression des gènes anti-apoptotiques plus importante en hypoxie chronique qu'en hypoxie intermittente, ou une expression de gènes pro-apoptotiques plus élevée en hypoxie intermittente qu'en hypoxie chronique.

Nous observons bien une surexpression de certains gènes anti-apoptotiques (comme BIRC3) plus importante en hypoxie chronique qu'en intermittente, mais le contraire est également observé, c'est le cas par exemple pour BCL2A1. Une expression plus élevée de certains gènes pro-apoptotiques (comme BAG1 et BID) en hypoxie intermittente est observée par rapport à l'hypoxie chronique, cependant, l'expression de ces gènes est parfois plus élevée en hypoxie chronique, c'est le cas par exemple de BNIP3 (Tableaux 2 et 3 de la partie Résultats). Il est donc à nouveau difficile de mettre en évidence une tendance générale.

Comme il l'a été mentionné précédemment, les cellules endothéliales en général sont très résistantes à l'apoptose, expliquant ainsi qu'il est difficile de mettre en évidence une protection par l'hypoxie si le degré d'apoptose de départ n'est pas important. Maxwell et al. (1999) avaient déjà montré que les cellules endothéliales HUVEC étaient résistantes à p53 et donc à l'apoptose, et ce parce que le niveau protéique de Bax ne variait pas dans ces cellules lors d'une surexpression de p53. Or, la lignée cellulaire EAhy926 est traitée à l'étoposide, une drogue cytotoxique qui provoque une surexpression de p53, et est obtenue à partir de la fusion entre des cellules HUVEC et des cellules issues d'un carcinome pulmonaire humain. Ce serait donc peut-être en ne faisant pas varier le niveau protéique de Bax que les cellules EAhy926 sont résistantes à l'apoptose induite par l'étoposide. Afin de mieux caractériser l'effet de l'hypoxie sur l'apoptose des cellules endothéliales EAhy926, il serait donc intéressant, dans la suite du travail, d'étudier par western blot si dans notre modèle cellulaire le niveau protéique de Bax varie ou pas. On pourra également envisager d'induire l'apoptose de ces cellules par une voie indépendante de p53.

Les changements d'expression génique sont régulés par l'activation de facteurs de transcription. L'augmentation de l'expression des gènes anti-apoptotiques et la diminution de l'expression des gènes pro-apoptotiques observées précédemment sont donc peut-être dues à des variations au niveau de l'activation de facteurs de transcription. Deux de ces facteurs connus pour jouer un rôle dans la régulation de l'apoptose ont donc été étudiés dans ce travail.

L'étoposide est une molécule qui inhibe la topoisomérase-II, ce qui aboutit à la création de dommages au niveau de l'ADN. Ceux-ci sont rapidement perçus par la cellule et conduisent à l'activation de p53. L'activation de p53 a pour conséquence l'arrêt du cycle cellulaire avec réparation ou diminution des dégâts, ou bien si les dommages sont trop conséquents, la mort cellulaire par apoptose. Ce serait donc peut-être en diminuant

l'activation de p53 que l'hypoxie protégerait les cellules de l'apoptose induite par l'étoposide. Nos résultats montrent que l'étoposide active effectivement bien p53 dans les cellules EAhy926. Par ailleurs, l'hypoxie qu'elle soit chronique ou intermittente diminue cette activation. Il serait intéressant de reproduire l'expérience de trans-AM mettant en évidence la liaison à l'ADN de p53 afin d'obtenir des résultats statistiquement interprétables et de vérifier les effets de l'étoposide et/ou de l'hypoxie sur l'activité de p53 par exemple par système rapporteur. Il serait également intéressant d'étudier l'effet, sur l'induction de l'apoptose, d'un inhibiteur de p53 comme la pifithrine ou d'inhiber l'expression de p53 par siRNA.

AP-1 est un autre facteur de transcription qui a été étudié afin de voir s'il jouait également un rôle dans la protection des cellules endothéliales apportée par l'hypoxie contre l'apoptose induite par l'étoposide. Il s'agit d'un dimère constitué des protéines c-jun/c-fos ou c-jun/c-jun qui, une fois activé, est impliqué dans la transcription des gènes qui font entrer la cellule en division. Ce serait donc peut-être en augmentant le niveau d'expression de ce facteur de transcription que l'hypoxie protégerait de l'apoptose. Nos résultats montrent que l'étoposide augmente la liaison à l'ADN de AP-1, alors que l'hypoxie seule n'a pas d'effet. Par ailleurs, l'hypoxie, quelles que soient les conditions, n'influence pas l'effet de l'étoposide. Nous avons alors utilisé un inhibiteur de la JUN Kinase pour inhiber l'activité de AP-1 et suivre l'influence de cette inhibition sur l'induction de l'apoptose. Cela nous a permis de voir que l'ajout de l'inhibiteur de AP-1 aggrave l'apoptose en présence d'étoposide que ce soit en normoxie ou en hypoxie. L'augmentation de l'activation du facteur de transcription AP-1 en présence d'étoposide peut donc expliquer en partie la protection des cellules endothéliales contre l'apoptose. Dans ces conditions AP-1 serait donc plutôt anti-apoptotique.

Bien que le facteur de transcription AP-1 soit connu pour être pro-apoptotique, un nombre croissant d'études suggère que l'expression élevée et/ou l'activation de c-jun promeuvent la survie cellulaire sous certaines conditions de stress. Potapova et al. (2001) ont par exemple montré que l'activation de c-jun, dépendante de la phosphorylation N-terminale, possède un rôle important dans la protection des cellules tumorales humaines contre l'apoptose induite par des agents qui endommagent l'ADN ; ce qui est tout à fait en accord avec nos résultats.

La figure 1 présente un résumé des résultats marquants intégrant les effets de l'hypoxie sur les changements d'activité de trois facteurs de transcription ainsi que sur les variations d'expression de certains de leurs gènes cibles. L'hypoxie apporterait un effet protecteur (i) en activant HIF-1 et la surexpression de gènes de survie comme MCL1 et (ii) en inhibant l'activation de p53, inhibant ainsi l'expression de gènes pro-apoptotiques tels que BAX. (iii) Par ailleurs, dans nos conditions expérimentales, AP-1 jouerait plutôt un rôle anti-apoptotique puisque son inhibition aggrave l'apoptose induite par l'étoposide. AP-1 pourrait être responsable de l'augmentation d'expression de gènes anti-apoptotiques comme BCL2A1 et BIRC3 ainsi que de la diminution d'expression de gènes pro-apoptotiques comme p53, Fas et p16^{INK4}. Ce rôle d'AP-1 reste cependant à être vérifié expérimentalement.

Nous suggérons donc au terme de ce travail que l'hypoxie protège les cellules endothéliales EAhy926 de l'apoptose induite par l'étoposide en partie en activant le facteur de transcription AP-1 et/ou en inhibant l'activation de p53, ce qui permet la surexpression de certains gènes anti-apoptotiques et la sous-expression de certains gènes pro-apoptotiques. Dans le but d'améliorer les thérapies anti-angiogéniques, il faudra donc exploiter plus en profondeur le rôle de ces deux facteurs de transcription et de l'expression de leurs gènes cibles pour combiner, dans le cadre d'un traitement anti-cancéreux, l'utilisation d'agents

induisant des dommages aux cellules endothéliales et celle d'agents interférant avec la réponse des cellules à l'hypoxie.

Bibliographie

Bibliographie

- Adams, J. M. & Cory, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**, 1322-6 (1998).
- Adrain, C., Creagh, E. M. & Martin, S. J. Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *Embo J* **20**, 6627-36 (2001).
- Amarante-Mendes, G. P. & Green, D. R. The regulation of apoptotic cell death. *Braz J Med Biol Res* **32**, 1053-61 (1999).
- Bergers, G. & Benjamin, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* **3**, 401-10 (2003).
- Bossy-Wetzel, E., Bakiri, L. & Yaniv, M. Induction of apoptosis by the transcription factor c-Jun. *Embo J* **16**, 1695-709 (1997).
- Brantley-Finley, C. et al. The JNK, ERK and p53 pathways play distinct roles in apoptosis mediated by the antitumor agents vinblastine, doxorubicin, and etoposide. *Biochem Pharmacol* **66**, 459-69 (2003).
- Bruick, R. K. Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9082-7 (2000).
- Buendia, B., Santa-Maria, A. & Courvalin, J. C. Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *J Cell Sci* **112** (Pt 11), 1743-53 (1999).
- Cain, K., Langlais, C., Sun, X. M., Brown, D. G. & Cohen, G. M. Physiological concentrations of K⁺ inhibit cytochrome c-dependent formation of the apoptosome. *J Biol Chem* **276**, 41985-90 (2001).
- Carmeliet, P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* **9**, 653-60 (2003).
- Chai, W. et al. The effects of glucose, insulin and oxidized low density lipoprotein on apoptosis in vascular endothelial cells. *Chin Med J (Engl)* **113**, 903-6 (2000).
- Ciardiello, F. et al. Inhibition of growth factor production and angiogenesis in human cancer cells by ZD1839 (Iressa), a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res* **7**, 1459-65 (2001).
- Claesson-Welsh, L. et al. Angiostatin induces endothelial cell apoptosis and activation of focal adhesion kinase independently of the integrin-binding motif RGD. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5579-83 (1998).
- Clifford, B., Beljin, M., Stark, G. R. & Taylor, W. R. G2 arrest in response to topoisomerase II inhibitors: the role of p53. *Cancer Res* **63**, 4074-81 (2003).
- Crompton, M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* **341** (Pt 2), 233-49 (1999).
- D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I. & Poirier, G. G. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* **342** (Pt 2), 249-68 (1999).
- Damayanthi, Y. & Lown, J. W. Podophyllotoxins: current status and recent developments. *Curr Med Chem* **5**, 205-52 (1998).
- Debatin, K. M. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* **53**, 153-9 (2004).
- Deplanque, G. & Harris, A. L. Anti-angiogenic agents: clinical trial design and therapies in development. *Eur J Cancer* **36**, 1713-24 (2000).
- Desagher, S. & Martinou, J. C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *trends in CELL BIOLOGY* **10**, 369-77 (2000).

- Dragovich, T., Rudin, C. M. & Thompson, C. B. Signal transduction pathways that regulate cell survival and cell death. *Oncogene* **17**, 3207-13 (1998).
- Duffy, J. P., Eibl, G., Reber, H. A. & Hines, O. J. Influence of hypoxia and neoangiogenesis on the growth of pancreatic cancer. *Mol Cancer* **2**, 12 (2003).
- Earnshaw, W. C., Martins, L. M. & Kaufmann, S. H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* **68**, 383-424 (1999).
- Edgell, C. J., McDonald, C. C. & Graham, J. B. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 3734-7 (1983).
- Ekert, P. G., Silke, J., Hawkins, C. J., Verhagen, A. M. & Vaux, D. L. DIABLO promotes apoptosis by removing MIHA/XIAP from processed caspase 9. *J Cell Biol* **152**, 483-90 (2001).
- Enari, M. et al. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**, 43-50 (1998).
- Erler, J. T. et al. Hypoxia-mediated down-regulation of Bid and Bax in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1-dependent and -independent mechanisms and contributes to drug resistance. *Mol Cell Biol* **24**, 2875-89 (2004).
- Fan, M., Goodwin, M. E., Birrer, M. J. & Chambers, T. C. The c-Jun NH(2)-terminal protein kinase/AP-1 pathway is required for efficient apoptosis induced by vinblastine. *Cancer Res* **61**, 4450-8 (2001).
- Fesik, S. W. & Shi, Y. Structural biology. Controlling the caspases. *Science* **294**, 1477-8 (2001).
- Gleadle, J. & Ratcliffe, P. Hypoxia. *Encyclopedia of life sciences/Nature Publishing Group*, 1-9 (2001).
- Gothié, E. & Pouyssegur, J. HIF-1 : régulateur central de l'hypoxie. *Médecine/Sciences* **18**, 70-8 (2002).
- Gross, A., McDonnell, J. M. & Korsmeyer, S. J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* **13**, 1899-911 (1999).
- Gupta, M. K. & Qin, R. Y. Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World J Gastroenterol* **9**, 1144-55 (2003a).
- Gupta, S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis (Review). *Int J Oncol* **22**, 15-20 (2003b).
- Hajitou, A. et al. The antitumoral effect of endostatin and angiostatin is associated with a down-regulation of vascular endothelial growth factor expression in tumor cells. *Faseb J* **16**, 1802-4 (2002).
- Ham, J., Eilers, A., Whitfield, J., Neame, S. J. & Shah, B. c-Jun and the transcriptional control of neuronal apoptosis. *Biochem Pharmacol* **60**, 1015-21 (2000).
- Hande, K. R. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer* **34**, 1514-21 (1998).
- Hengartner, M. O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770-6 (2000).
- Hsu, H., Xiong, J. & Goeddel, D. V. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* **81**, 495-504 (1995).
- Jain, R. K. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med* **7**, 987-9 (2001).
- Janssens, D. et al. Protection of hypoxia-induced ATP decrease in endothelial cells by ginkgo biloba extract and bilobalide. *Biochem Pharmacol* **50**, 991-9 (1995).
- Jussila, L. & Alitalo, K. Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol Rev* **82**, 673-700 (2002).

- Kannan, K., Amariglio, N., Rechavi, G. & Givol, D. Profile of gene expression regulated by induced p53: connection to the TGF-beta family. *FEBS Lett* **470**, 77-82 (2000).
- Kelekar, A. & Thompson, C. B. Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol* **8**, 324-30 (1998).
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-57 (1972).
- Kothakota, S. et al. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* **278**, 294-8 (1997).
- Krajewski, S. et al. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* **53**, 4701-14 (1993).
- Kroemer, G., Zamzami, N. & Susin, S. A. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* **18**, 44-51 (1997).
- Li, M. T., Sun, J., Qiu, P. X. & Yan, G. M. Mitochondrial Mechanisms of Bcl-2 on Ionizing Radiation-induced Apoptosis. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* **29**, 495-502 (1997).
- Liu, Y., Cox, S. R., Morita, T. & Kourembanas, S. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res* **77**, 638-43 (1995).
- Longthorne, V. L. & Williams, G. T. Caspase activity is required for commitment to Fas-mediated apoptosis. *Embo J* **16**, 3805-12 (1997).
- Maquoi, E. et al. Anti-invasive, antitumoral, and antiangiogenic efficacy of a pyrimidine-2,4,6-trione derivative, an orally active and selective matrix metalloproteinases inhibitor. *Clin Cancer Res* **10**, 4038-47 (2004).
- Marzo, I., Brenner, C. & Kroemer, G. The central role of the mitochondrial megachannel in apoptosis: evidence obtained with intact cells, isolated mitochondria, and purified protein complexes. *Biomed Pharmacother* **52**, 248-51 (1998).
- Maxwell, S. A., Acosta, S. A. & Davis, G. E. Induction and alternative splicing of the Bax gene mediated by p53 in a transformed endothelial cell line. *Apoptosis* **4**, 109-14 (1999).
- McCarty, M. F. et al. Promises and pitfalls of anti-angiogenic therapy in clinical trials. *Trends Mol Med* **9**, 53-8 (2003).
- Meresse, P., Dechaux, E., Monneret, C. & Bertounesque, E. Etoposide: discovery and medicinal chemistry. *Curr Med Chem* **11**, 2443-66 (2004).
- Michiels, C. Physiological and pathological responses to hypoxia. *Am J Pathol* **164**, 1875-82 (2004).
- Oltvai, Z. N., Millman, C. L. & Korsmeyer, S. J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**, 609-19 (1993).
- Papetti, M. & Herman, I. M. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* **282**, C947-70 (2002).
- Piret, J. P. et al. Hypoxia-inducible factor-1-dependent overexpression of myeloid cell factor-1 protects hypoxic cells against tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis. *J Biol Chem* **280**, 9336-44 (2005).
- Pitti, R. M. et al. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* **271**, 12687-90 (1996).
- Potapova, O., Basu, S., Mercola, D. & Holbrook, N. J. Protective role for c-Jun in the cellular response to DNA damage. *J Biol Chem* **276**, 28546-53 (2001).

- Pulukuri, S. M. & Rao, J. S. Activation of p53/p21Waf1/Cip1 pathway by 5-aza-2'-deoxycytidine inhibits cell proliferation, induces pro-apoptotic genes and mitogen-activated protein kinases in human prostate cancer cells. *Int J Oncol* **26**, 863-71 (2005).
- Rajendran, J. G. & Krohn, K. A. Imaging hypoxia and angiogenesis in tumors. *Radiol Clin North Am* **43**, 169-87 (2005).
- Ravagnan, L., Roumier, T. & Kroemer, G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol* **192**, 131-7 (2002).
- Reed, J. C. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* **17**, 3225-36 (1998).
- Reed, J. C. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* **157**, 1415-30 (2000).
- Sakahira, H., Enari, M. & Nagata, S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* **391**, 96-9 (1998).
- Samejima, K., Tone, S. & Earnshaw, W. C. CAD/DFF40 nuclease is dispensable for high molecular weight DNA cleavage and stage I chromatin condensation in apoptosis. *J Biol Chem* **276**, 45427-32 (2001).
- Schlesinger, P. H. et al. Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11357-62 (1997).
- Semenza, G. L. Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences. *Biochem Pharmacol* **59**, 47-53 (2000).
- Semenza, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **3**, 721-32 (2003).
- Senger, D. R. et al. Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through $\alpha 1 \beta 1$ and $\alpha 2 \beta 1$ integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13612-7 (1997).
- Shimizu, K. & Oku, N. Cancer anti-angiogenic therapy. *Biol Pharm Bull* **27**, 599-605 (2004).
- Shimizu, S., Narita, M. & Tsujimoto, Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399**, 411-2 (1999).
- Smith, G. C., d'Adda di Fagagna, F., Lakin, N. D. & Jackson, S. P. Cleavage and inactivation of ATM during apoptosis. *Mol Cell Biol* **19**, 6076-84 (1999).
- Stempien-Otero, A. et al. Mechanisms of hypoxia-induced endothelial cell death. Role of p53 in apoptosis. *J Biol Chem* **274**, 8039-45 (1999).
- Sun, Y. Identification and characterization of genes responsive to apoptosis: application of DNA chip technology and mRNA differential display. *Histol Histopathol* **15**, 1271-84 (2000).
- Thompson, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456-62 (1995).
- Vander Heiden, M. G., Chandel, N. S., Schumacker, P. T. & Thompson, C. B. Bcl-xL prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange. *Mol Cell* **3**, 159-67 (1999).
- Vaupel, P. & Harrison, L. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *Oncologist* **9 Suppl 5**, 4-9 (2004).
- Verhagen, A. M. et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**, 43-53 (2000).
- Wang, C. Y., Guttridge, D. C., Mayo, M. W. & Baldwin, A. S., Jr. NF-kappaB induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* **19**, 5923-9 (1999).
- Wang, H., Li, J., Bostock, R. M. & Gilchrist, D. G. Apoptosis: A Functional Paradigm for Programmed Plant Cell Death Induced by a Host-Selective Phytotoxin and Invoked during Development. *Plant Cell* **8**, 375-391 (1996).

- Wenger, R. H. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J* **16**, 1151-62 (2002).
- Wyllie, A. H. Apoptosis: cell death in tissue regulation. *J Pathol* **153**, 313-6 (1987).

Webographie

<http://webcampus.fundp.ac.be/SBIO2132>

http://www.graylab.ac.uk/research/groups/tumour_microcirculation/

<http://www.utc.fr/~farges/>

http://medidacte.timone.univ-mrs.fr/webcours/biocell/biopath_cell/prion/apoptose.html

<http://claim.springer.de/EncRef/CancerResearch/samples/0003.htm>

Annexe 1 : Liste des gènes détectables à l'aide de la DualChip™ human apoptosis

<u>Official symbol</u>	<u>Gene annotation</u>	<u>Gene</u>	<u>General function</u>	<u>Specific function/Remark</u>
ABL1	ABL1	v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1	Cell cycle	Kinase activity
ADAM 17	ADAM 17	a disintegrin and metalloproteinase domain 17 (tumor necrosis factor, alpha, converting enzyme)	Cell migration	Metalloendopeptidase activity
AKT1	AKT1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	Apoptosis	Receptor signaling protein serine/threonine kinase activity
AKT2	AKT2	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2	Apoptosis	Receptor signaling protein serine/threonine kinase activity
BAD	BAD	BCL2-antagonist of cell death	Apoptosis	Pro-apoptotic; BCL2 binding protein
BAG1	BAG	BCL2-associated athanogene	Apoptosis	Pro-apoptotic; BCL2 binding protein
BAK 1	BAK 1	BCL2-antagonist/killer 1	Apoptosis	Pro-apoptotic; BCL2 binding protein
BAX	BAX	BCL2-associated X protein	Apoptosis	Pro-apoptotic; BCL2 binding protein
BCL2	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	Apoptosis	Anti-apoptotic
BCL2A1	BCL2A1	BCL2-related protein A1	Apoptosis	Apoptosis regulator activity
BclX	BclX	BCLX protein	Apoptosis	Induces or Inhibits apoptosis according to the alternative form
BID	BID	BH3 interacting domain death agonist	Apoptosis	Pro-apoptotic; Death receptor pathway
BIK	BIK	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)	Apoptosis	Pro-apoptotic
BIRC2	BIRC2	baculoviral IAP repeat-containing 2 (c-IAP1)	Apoptosis	Inhibitor of caspase-3, -7 and -9.
BIRC3	BIRC3	baculoviral IAP repeat-containing 3 (c-IAP2)	Apoptosis	Inhibitor of caspase-3, -7 and -9.
BIRC4	BIRC4	baculoviral IAP repeat-containing 4 (XIAP)	Apoptosis	Inhibitor of caspase-3, -7 and -9.
BIRC5	BIRC5	baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	Apoptosis	Inhibitor of caspase-3, -7 and -9.
BNIP3	BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	Apoptosis	Pro-apoptotic; Binds to the adenovirus E1B 19 kDa protein or to BCL-2
CASP1	CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine protease (interleukin 1 beta convertase)	Inflammation	Interleukin 1 beta convertase
CASP2	CASP2	caspase 2, apoptosis-related cysteine protease	Apoptosis	Initiator caspase
CASP3	CASP3	caspase 3, apoptosis-related cysteine protease	Apoptosis	Effector caspase
CASP4	CASP4	caspase 4, apoptosis-related cysteine protease	Apoptosis	Initiator caspase
CASP8	CASP8	caspase 8, apoptosis-related cysteine protease	Apoptosis	Initiator caspase
CCND1	cnd1	cyclinD1	Cell cycle	Regulatory subunit of CDK4 or CDK6
CCND2	cnd2	cyclinD2	Cell cycle	Regulatory subunit of CDK4 or CDK7
CCNH	CCNH	cyclin H	Cell cycle	Phosphorylates and activates cyclin-dependant protein kinases
CDC2	CDC2	cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	Cell cycle	Cyclin-dependent protein kinase activity
CDC25C	CDC25C	cell division cycle 25C	Cell cycle	Dephosphorylates CDC2
CDC6	CDC6	CDC6 cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae)	Cell cycle	DNA replication initiation

CDK2	CDK2	cyclin-dependent kinase 2	Cell cycle	Cyclin-dependent protein kinase activity
CDK4	CMM3	cyclin-dependent kinase 4	Cell cycle	Cyclin-dependent protein kinase activity
CDK5	CDK5	cyclin-dependent kinase 5	Cell cycle	Cyclin-dependent protein kinase activity
CDK5R1	p35	cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35)	Cell cycle	Activates the kinase
CDK6	cdk6	cyclin-dependent kinase 6	Cell cycle	Cyclin-dependent protein kinase activity
CDK7	cdk7	cyclin-dependent kinase 7 (MO15 homolog, Xenopus laevis, cdk-activating kinase)	Cell cycle	Cyclin-dependent protein kinase activity
CDK9	cdk9	cyclin-dependent kinase 9 (CDC2-related kinase)	Cell cycle	Cyclin-dependent protein kinase activity
CDKN1A	p21	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	Cell cycle	Inhibitor of G1-specific CDK-cyclin complexes
CDKN1C	p57	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	Cell cycle	Inhibitor of G1-specific CDK-cyclin complexes
CDKN2A	p16	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	Cell cycle	Inhibitor of CDK4
CDKN2B	p14-15	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15)	Cell cycle	Inhibitor of CDK4
CFLAR	CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator (cFLIP)	Apoptosis	Adaptor, anti-apoptotic
CLK1	CLK1	CDC-like kinase 1	Cell cycle	Protein serine/threonine kinase activity
CLU	APOJ	Apolipoprotein J (clusterin)	Stress response	Chaperone
CRADD	CRADD	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain	Apoptosis	Adaptor
CSE1L	CSE1L	CSE1 chromosome segregation 1-like (CAS)	Cell proliferation	Intracellular protein transport
DDIT4L	REDD2	DNA damage response 2 (DDIT4L)		Unknown function
DFFA	DFFA	DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide	Apoptosis	DNAse inducing inter-nucleosomal fragmentation
E2F1	E2F1	E2F transcription factor 1	Transcription	Transcription factor
E2F3	E2F3	E2F transcription factor 3	Transcription	Transcription factor
E2F5	E2F5	E2F transcription factor 5, p130-binding	Transcription	Transcription factor
FADD	FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	Apoptosis	Adaptor
GADD45A	GADD45A	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	Stress response	DNA damage repair
GAS1	GAS1	growth arrest-specific 1	DNA repair	Cell cycle arrest in G1
GPX1	GPX	glutathione peroxidase 1	Oxidative metabolism	Antioxidant enzyme
GRB2	GRB2	growth factor receptor-bound protein 2	Cell cycle	Adaptor for growth factor receptors
GSA	GSA	glutathione S-transferase A1	Drug metabolism	Glutathione (phase II)
GSM	GSM	glutathione S-transferase M1	Drug metabolism	Glutathione (phase II)
GSR	GSR	glutathione reductase	Drug metabolism	Glutathione reductase
GSTP1	GSTP1	Glutathione S-transferase pi	Drug metabolism	Glutathione (phase II)
GSTT1	GSTT1	Glutathione S-transferase theta1	Drug metabolism	Glutathione (phase II)
IGF1	IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	Growth factor and cytokines	Growth factor

IGF1R	IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor	Cell signaling / receptor	Growth factor receptor	
IGF2	IGF2	insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)	Growth factor and cytokines	Growth factor	
IGF2R	IGF2R	insulin-like growth factor 2 receptor	Cell signaling / receptor	Growth factor receptor	
IGFBP2	IGF2	insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa	Cell proliferation	Growth factor modulation	
IGFBP3	IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3	Cell proliferation	Growth factor modulation	
IGFBP4	IGFBP4	insulin-like growth factor binding protein 4	Cell proliferation	Growth factor modulation	
IGFBP5	IGFBP5	insulin-like growth factor binding protein 5	Cell proliferation	Growth factor modulation	
IGFBP6	IGFBP6	insulin-like growth factor binding protein 6	Cell proliferation	Growth factor modulation	
ING	ING1	inhibitor of growth family, member 1	Cell proliferation	Growth inhibitor	
JUN	JUN	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog	Transcription	Transcription factor subunit (AP-1)	
LTA	TNFB	lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)	Growth factor and cytokines	Induction of apoptosis	
LTB	LTB	lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)	Growth factor and cytokines	Role in immune response	
MAP2K1	MEK1	mitogen-activated protein kinase kinase 1	Cell cycle	Protein dual kinase activity	
MAP2K5	MAP2K5	mitogen-activated protein kinase kinase 5	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity	
MAP2K6	MAP2K6	mitogen-activated protein kinase kinase 6	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity	
MAP3K14	MAP3K14	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity	
MAPK1	erk2	mitogen-activated protein kinase 1	Proliferation	Protein serine/threonine kinase activity	
MAPK10	JNK3	mitogen-activated protein kinase 10	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity	
MAPK12	MAPK12	mitogen-activated protein kinase 12	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity	
MAPK14	MAPK14	mitogen-activated protein kinase 14	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity	
MAPK3	erk1	mitogen-activated protein kinase 3	Proliferation	Protein serine/threonine kinase activity	
MAPK7	erk5	mitogen-activated protein kinase 7	Proliferation	Protein serine/threonine kinase activity	
MAPK8	JNK1	mitogen-activated protein kinase 8	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity , regulates c-jun	
MAPK9	JNK2	mitogen-activated protein kinase 9	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity , regulates c-jun	
MCL1	MCL1	myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	Apoptosis	Anti-apoptotic	
MDM2	MDM2	Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein (mouse)	Oncogenesis	Ubiquitin ligase for p53	
MGST1	MGST1	microsomal glutathione S-transferase 1	Glutathione metabolism	Transferase activity	
MYCN	MYCN	v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (c-myc)	Transcription	Transcription factor	
NFATC1	NFATC1	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1	Transcription	Transcription factor	

NFKB1	NFKB	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)	Transcription	Transcription factor
NOS2A	NOS2A	nitric oxide synthase 2A (inducible)	Electron transport	Nitric-oxide synthase activity
PCNA	PCNA	proliferating cell nuclear antigen	Cell cycle	Increasing the polymerase's processibility
PDE1B	PDE1B	phosphodiesterase 1B, calmodulin-dependent	Apoptosis	Calmodulin-dependent cyclic-nucleotide phosphodiesterase activity
PLD1	PLD1	phospholipase D1, phosphatidylcholine-specific	Phospholipid metabolism	Phospholipase D activity
PLK	PLK	polo-like kinase	Cell cycle	Phosphorylate cdc25A, initiating cell cycle
POR	POR	P450 (cytochrome) oxidoreductase	Electron transport	Oxidoreductase activity
RAF1	RAF1	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	Signal transduction	Kinase in growth factor-induced MAPK cascade
RARB	RARB	retinoic acid receptor, beta	Transcription	Receptor of retinoic acid, transcription factor
RB1	RB1	retinoblastoma 1 (pRB)	Cell cycle	Transcription repressor, binds E2F
RBL2	RB2	retinoblastoma-like 2 (p130)	Cell cycle	Negative regulation of cell cycle
RBP1	RBP1	retinoblastoma binding protein 1	Cell cycle	Transcription repressor
RIPK1	RIPK1	receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity
TANK	TANK	TRAF family member-associated NFKB activator	Signal transduction	Adaptor
TFDP1	DP1	transcription factor Dp-1	Transcription	Transcription factor ; Pol II transcription
TFDP2	DP2	transcription factor Dp-2 (E2F dimerization partner 2)	Transcription	Transcription factor ; Pol II transcription
TNF	TNFa	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	Cytokine	Pro-apoptotic cytokine
TNFRSF10A	TNFRSF10A	tumor necrosis factor receptor superfamily (TRAIL-R1)	Apoptosis	Receptor
TNFRSF10B	TNFRSF10B	tumor necrosis factor receptor superfamily (TRAIL-R2)	Apoptosis	Receptor
TNFRSF1A	TNFRSF1A	tumor necrosis factor receptor superfamily (TNF-R1, p55)	Apoptosis	Receptor
TNFRSF1B	TNFRSF1B	tumor necrosis factor receptor superfamily (TNF-RII, p80)	Apoptosis	Receptor
TNFRSF6	TNFRSF6	tumor necrosis factor receptor superfamily (FAS)	Apoptosis	Receptor
TNFSF10	TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily (TRAIL)	Apoptosis	Tumor necrosis factor receptor binding
TNFSF5	TNFSF5	tumor necrosis factor (ligand) superfamily (CD40 ligand)	Apoptosis	Tumor necrosis factor receptor binding
TNFSF6	TNFSF6	tumor necrosis factor (ligand) superfamily (FAS ligand)	Apoptosis	Tumor necrosis factor receptor binding
TNFSF7	TNFSF7	tumor necrosis factor (ligand) superfamily (CD27 ligand)	Apoptosis	Tumor necrosis factor receptor binding
TP53	p53	tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)	Transcription	Transcription factor
TP73	TP73	tumor protein p73	Transcription	Transcription factor
TRADD	TRADD	TNFRSF1A-associated via death domain	Apoptosis	Adaptor
TRAF2	TRAF2	TNF receptor-associated factor 2	Signal transduction	Adaptor
TRAF3	TRAF3	TNF receptor-associated factor 3	Signal transduction	Adaptor
TRAF5	TRAF5	TNF receptor-associated factor 5	Signal transduction	Adaptor
TRAF6	TRAF6	TNF receptor-associated factor 6	Signal transduction	Adaptor

